

03096

2



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA: UNA ALTERNATIVA
PARA LA PURIFICACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
ORGANISMOS MARINOS

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Química Acuática)

p r e s e n t a

JOHANNA MORALES WHITNEY

Director de Tesis: Dra. Araceli Peña Alvarez

Comité Tutorial: M. en C. Santiago Capella Vizcaíno

Dr. Martín Merino Ibarra.

México, D.F. 2000

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

AGRADECIMIENTOS

Con seguridad ésta es la única parte de cualquier trabajo que no puede ser sometida a la crítica, ni mucho menos a la discusión. Estas líneas solamente son de quien las escribe, teniendo todo el privilegio de realizarlas a su parecer. Por lo tanto, suelen ser totalmente subjetivas y este trabajo no será la excepción.

Concluir esta tesis quizás sea el final de una de las etapas más difíciles de aceptar, Pero eso sí la más esperada después de varios años de trabajo, resultado de un gran esfuerzo. Realizarla de ninguna manera fue una tarea individual, por el contrario representa el esfuerzo de muchas personas. Sintiendo la necesidad de agradecer y reconocerles como un acto de justicia.

Corriendo el riesgo del olvido involuntario y asumiendo dicha responsabilidad, espero mencionar más o menos en voz alta cada uno de esos nombres importantes que la hicieron posible.

Para comenzar, a la Universidad Nacional y al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) donde pude continuar mi formación profesional y conseguir tan anhelado deseo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por brindarme el apoyo económico para emprender esta dura pero feliz jornada.

Tanta formalidad no puede romperse mencionando a todas las lindas personitas de carne y hueso, que me acompañaron en esta chocoaventura. La Dra. Aráceli Peña A., quien fue asesora de esta tesis me dio todo su apoyo, confianza y consejos para salir adelante. Así como por ofrecerme la oportunidad de conocer nuevos horizontes.

A la maestra Carmen Larrea, si no me hubiera ayudado (afortunadamente para todos los que trabajamos en el laboratorio) ante cualquier dificultad que se presento. Al entrar al laboratorio de Cromatografía de Gases (Facultad de Química) uno no debe preocuparse por no saber, seguramente ella constantemente te ayudará.

El Dr. Martín Merino, tuvo a bien dar apoyo a mí y a mis apestositos bichitos en su laboratorio de Biogeoquímica marina del ICMyL, mientras se vivían tiempos tensos en la Universidad.

Al maestro Santiago Capella, quien me ayudó en todo momento y sobretodo a complementar todos aquellos huecos que tenía este trabajo con sus acertadas reflexiones y observaciones.

Así como también al Dr. Alfonso Vásquez B. y Dr. Gerardo Gold B. Y a pesar del esfuerzo de todos, debo aclarar que los errores y omisiones corren por exclusiva cuenta.

Igualmente en la conspiración de este trabajo participaron: M. en C. Lilia Castro, Dra. Evangelina Camacho, QFB. Román Pérez y al Dr. Luis Soto por brindarme la asistencia y apoyo técnico para la realización de esta tesis.

Y a todos aquellos que tuvieron algo que ver en la narración de esta historia, aunque voluntariamente no lo quisieron, a: Noemí Canales, Jacqueline Téllez, Laura Díaz, Cristina Reséndiz, Horacio, Sergio Castillo, Pablo Hernández, Roberto Santiago, Alex Arias y mis compañeros de Maestría.

A mis padres, quienes en todo momento siempre me brindaron su apoyo y cariño, que es el tesoro más grande que puedo poseer.

Por el lazo de amistad y cariño que siempre me unirá con mis hermanos, Jessica y Jorge.

Por último, estoy en deuda con mi cómplice, amigo y novio, Gabriel Origel, por su apoyo constante, amor y paciencia. Siempre estuvo a mi lado y sin su valiosa ayuda nunca hubiera terminado. Te amo, Gabriel ♥

INDICE

	Pág.
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Propiedades fisico-químicas de los HAPs	4
2.2 HAPs en el ambiente acuático	7
2.3 Concentraciones de HAPs en los organismos acuáticos	8
2.4 Metodología analítica para la determinación de HAPs	9
2.4.1 Extracción	11
2.4.2 Concentración	12
2.4.3 Purificación	13
2.4.3.1 Extracción en fase sólida (EFS)	13
2.4.4 Análisis instrumental	16
2.4.5 Identificación y cuantificación	17
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos particulares	18
4. METODOLOGÍA	
4.1 Introducción	19
4.2 Conservación y almacenamiento de la muestra	19
4.3 Limpieza del material	19
4.3.1 Material	20
4.4 Soluciones y reactivos	20
4.5 Material biológico	22
4.6 Condiciones cromatográficas	22
4.7 Procedimiento	
4.7.1 Preparación de la muestra	23
4.7.1.1 Liofilización	24

4.7.1.2 Fortificación	25
4.7.1.3 Saponificación y extracción líquido/líquido	25
4.7.2 Purificación por cromatografía en columna	25
4.7.3 Purificación por extracción en fase sólida	27
4.7.3.1 Acondicionamiento y elución de los cartuchos	28
4.8 Identificación y cuantificación de HAPs	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1 Procedimiento de purificación por cromatografía en columna	31
5.2 Procedimiento de purificación por Extracción en Fase Sólida (EFS)	32
5.3 Optimización de las condiciones cromatográficas	34
5.4 Recuperación de la solución estándar de HAPs en EFS	34
5.5 Estandarización del método analítico con tejido de pescado fortificado	35
5.5.1 Análisis de la fracción alifática	36
5.5.1.1 Recuperación de HAPs en la fracción alifática en tejido de pescado fortificado	38
5.5.2 Análisis de la fracción aromática	40
5.5.2.1 Recuperación de HAPs en la fracción aromática en tejido de pescado fortificado	42
5.5.3 Recuperación total de HAPs en tejido de pescado fortificado	45
5.6 Curva de calibración	47
5.7 Ventajas y desventajas en el uso de la EFS	50
5.8 Aplicación del método propuesto en muestras de organismos marinos	51
6. CONCLUSIONES	58
7. LITERATURA CITADA	59

RESUMEN

Debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) han sido estudiados ampliamente. Para monitorear los niveles de estos contaminantes en los ambientes marinos se ha requerido el uso de organismos bioindicadores. Para la determinación de los HAPs en tejidos de organismos marinos se han desarrollado diversos métodos para la extracción, concentración, identificación y cuantificación de estos analitos. Este tipo de matrices contienen mezclas complejas de compuestos de naturaleza lipofílica que interfieren en el análisis de los HAPs. Como resultado de ello es común observar la subestimación o sobreestimación de estos contaminantes.

En este estudio se compara el procedimiento tradicional por cromatografía en columna con la Extracción en Fase Sólida (EFS) para la determinación de HAPs en organismos marinos por cromatografía de gases capilar (CGC). El método propuesto fue aplicado en tejido de organismos marinos (pescado, camarón y ostión).

Las muestras de tejido liofilizado se saponificarán con KOH en metanol y se extrajeron con hexano. El extracto se purificó por ambos procedimientos. El método de purificación tradicional se llevó a cabo en columnas empacadas con gel de sílice, alúmina, sulfato de sodio anhídrido y cobre activado. La EFS se realizó en cartuchos comerciales de aminopropil (LC-NH₂) y sílica gel (LC-Silica). Los extractos que se obtuvieron se analizaron por CGC. La identificación de los HAPs se realizó comparando los tiempos de retención con estándares externos y la cuantificación a través del factor de respuesta de cada uno de los HAPs.

Los porcentajes de recuperación de los HAPs se estimaron utilizando matrices de organismos marinos fortificados. Los resultados que se generaron en ambos procedimientos fueron comparados. Los porcentajes de recuperación total de HAPs fueron $42.0 \pm 2.80\%$ para cromatografía en columna, $56.87 \pm 6.23\%$ para LC-NH₂ y $58.56 \pm 4.84\%$ para LC-Silica. El límite de detección de la curva de calibración para el método propuesto fue de 75ppb para 15 HAPs y para naftaleno de 250ppb.

El método de EFS presenta ventajas sobre el procedimiento de purificación convencional; ya que se obtienen extractos libres de los principales compuestos que interfieren en su análisis, además de reducir costos y tiempo del mismo.

1. Introducción

En el país existen importantes regiones costeras con gran potencial económico que han sido contaminadas como resultado de la combinación de factores naturales y antropogénicos (GESAMP, 1990). El principal efecto inmediato de la actividad petrolera a los ambientes costeros se refleja en el posible riesgo a la salud de la población humana al consumir productos marinos contaminados por derivados carcinogénicos del petróleo tales como los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (Geraci y St.Aubin, 1990; DeLeon et al., 1988).

Los HAPs se originan de la combustión incompleta o pirólisis de la materia orgánica, por la actividad natural o antropogénica. Por diagénesis o biosíntesis se producen cantidades muy pequeñas (NRCC, 1983). Factores tales como el tipo y cantidad de combustible, temperatura, duración de la combustión y disponibilidad de oxígeno determina la naturaleza y grado de formación de HAP.

En el ambiente, en general, los HAPs son contaminantes prioritarios; debido a las propiedades carcinogénicas. En la mayoría de las determinaciones se limita el análisis a 16 compuestos en matrices tales como agua potable, industrial y de desecho, sedimentos, suelos, partículas atmosféricas, así como también en tejidos biológicos. Dentro de los ambientes acuáticos los HAPs sufren una serie de procesos de intemperización (físicos, químicos y biológicos), tales como la evaporación, oxidación fotoquímica, degradación microbiana, dispersión y disolución en el agua (Neff, 1979; Green y Trett, 1989). Los HAPs se asocian fácilmente con la materia particulada y finalmente se depositan en el sedimento (Farrington et al., 1983, Farrington, 1991; Jackson et al., 1994; Witt, 1995; Hellou, 1996).

A través del agua, sedimentos o material suspendido los organismos marinos se ven expuestos a los HAPs. Los HAPs pasan a través de la membrana celular, dentro de la célula pueden interactuar con el DNA y causar daño genético y activación metabólica permitiendo la aparición de tumores y otras enfermedades (Fuoco y Colombini, 1997). Los hidrocarburos tienden a acumularse en los tejidos liposos, aun si los contaminantes se encuentran en bajas concentraciones en el medio (Peña et al., 1996). En general, estos procesos son más complejos en los vertebrados que en los invertebrados. En los vertebrados, como son los peces, se incrementa la producción de enzimas hepáticas lo cual les permite romper los

HAPs, reduciendo posiblemente los efectos tóxicos de estos químicos. Los organismos tales como mejillones y ostiones, que se creía que carecían de sistemas enzimáticos, acumulan altas concentraciones de contaminantes, debido a que sus tasas metabólicas son menores (Lee et al., 1972; Livingstone et al., 1989; Stegeman y Lech, 1991). Como consecuencia de ello han sido utilizados como organismos centinelas e integradores de las condiciones de la calidad del agua en los ecosistemas marinos ya que proveen de información útil acerca del potencial de biomagnificación en las cadenas tróficas (Mason, 1987; Burns y Knapp, 1989).

La dificultad en la interpretación y comparación de los resultados en estas matrices, (tejidos biológicos) se debe a que los HAPs son lipofílicos, por lo que la elección de la metodología analítica (procedimientos de extracción y limpieza) dependerá de diversos factores tales como las características físico-químicas de los analitos, el límite de detección requerido, el nivel y tipo de interferencias, la resolución que se requiere, precisión y exactitud de los instrumentos disponibles, tiempo de análisis y costo.

Los análisis generalmente se realizan por Cromatografía de Gases Capilar (CGC), acoplado a espectroscopía de masas (CGC/EM), Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con arreglo de diodos, HPLC con detector de fluorescencia o HPLC/UV con ambos detectores conectados en serie (Lee et al., 1981; Kicinski et al., 1989; Gratzfeld et al., 1993). No importando la matriz en donde se realice el análisis, se requiere su purificación para la eliminación de los compuestos interferentes antes del análisis cromatográfico. La mayoría de los estudios realizados llevan a cabo este procedimiento por cromatografía en columna empacada con alumina, florisil y/o silica (Wise et al., 1977). A través del proceso de adsorción se separan los analitos que interfieren en el análisis con intervalos bien definidos y estrechos de polaridad. Entre las desventajas que presenta este procedimiento se incluyen la actividad de los cambios en los adsorbentes, la utilización de grandes volúmenes de disolventes de alta pureza, los cuales deben ser evaporados para concentrar los analitos a analizar, así como el tiempo total del análisis.

Los análisis de HAPs en organismos son particularmente difíciles debido a la baja concentración de los compuestos individuales ya que generalmente la cantidad de

material disponible es limitado. El pretratamiento de la muestra antes de los análisis cromatográficos es largo, en algunos casos el tiempo de extracción de los HAPs dura hasta 56 horas (Al-Saad, 1996), por lo que se requieren de procesos de purificación y preconcentración más eficientes, confiables y rápidos. La Extracción en Fase Sólida (EFS) resulta una alternativa para este procedimiento, debido a la reducción del tiempo de análisis y costos del mismo.

Los principios de la EFS son similares a la cromatografía de líquidos, donde los compuestos se separan entre dos fases. En la EFS los analitos a extraer se separan entre una fase estacionaria y una móvil, y estos analitos deben tener gran afinidad por la fase sólida más que por la matriz (retención o adsorción). Los compuestos retenidos en la fase estacionaria pueden ser removidos en un paso posterior por la elución con un disolvente con mayor afinidad para los analitos (elución o desorción). Los diferentes mecanismos de retención o elución son debido a las fuerzas intermoleculares entre el analito y los sitios activos en la superficie del absorbente y la fase líquida o matriz. Las fases estacionarias empleadas en la EFS son generalmente similares a las utilizadas en la cromatografía líquida. De acuerdo al carácter químico del grupo funcional unido a la Silica o al copolímero, las fases resultantes se pueden clasificar en: no polares, polares o intercambio iónico. La elección de los disolventes utilizados depende de la naturaleza de la fase estacionaria (Berrueta *et al.*, 1995).

El objetivo de esta investigación fue proponer y evaluar la EFS como procedimiento alternativo de purificación en la metodología analítica para la determinación de HAPs en organismos marinos. Dicho procedimiento fue comparado con el método tradicional (Cromatografía en columna) en términos de su exactitud, precisión y recuperación.

2. ANTECEDENTES

2.1. Propiedades físico-químicas de los HAPs

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de más de 100 compuestos orgánicos que contienen 2 ó más anillos de benceno en su estructura. En base a sus propiedades y peso molecular se dividen en 2 categorías: compuestos de bajo peso molecular (2 a 3 anillos aromáticos, de naftaleno a antraceno) y compuestos de alto peso molecular (4 ó más anillos aromáticos, de fluoranteno a indeno [1,2,3-cd] pireno, Figura 1). Los HAPs de bajo peso molecular muestran toxicidad aguda mientras que algunos HAPs de alto peso molecular muestran potencial carcinogénico (Neff, 1979; Futoma *et al.*, 1981; White, 1986; Varansi, 1989).

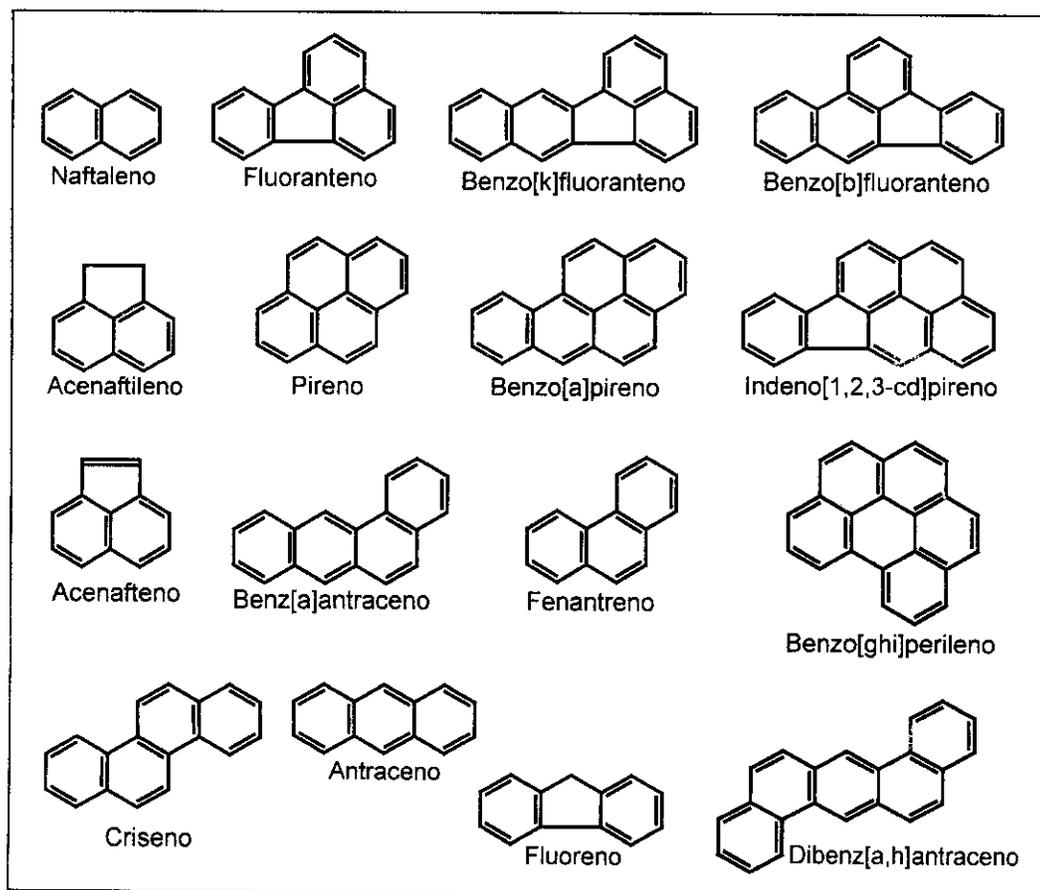


Figura 1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

En la tabla 1 se reportan las propiedades fisico-químicas de los 16 HAPs seleccionados como contaminantes prioritarios por la Organización Mundial de la Salud, la Comunidad Económica Europea y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (Futoma *et al.*, 1981; Hellou, 1996). Las propiedades físicas de los HAPs varían de acuerdo a su peso molecular y estructura. Todos los HAPs son sólidos a 25°C. Al incrementar su peso molecular o volumen se observan cambios profundos, como la disminución de su solubilidad en agua y de su presión de vapor (P^s), mientras que el coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}) se incrementa. Sus K_{ow} son parcialmente altos, indicando un alto potencial en la absorción de partículas suspendidas en el aire y agua y bioconcentración en organismos (NRCC, 1983; Slooff *et al.*, 1989).

Aunque es conveniente considerar esta clase de compuestos como un solo grupo de compuestos hidrofóbicos y persistentes, debido a sus similitudes estructurales sus propiedades varían considerablemente con la temperatura; estas variaciones se reflejan en diferencias significativas en los coeficientes de partición en el ambiente (Mackay y Calcott, 1998).

Tabla 1. Propiedades fisico-químicas de los principales HAPs.

Nombre (abreviaturas, en inglés)	Fórmula	P.M. (g/mol)	P.F. (°C)	P.E. (°C)	V^M (cm ³ /mol)	F a 25°C	p^S	S (g/mol)	Log K_{ow}	H
Naftaleno (NA)	C ₁₀ H ₈	128.19	80.5	218	148	0.2830	10.4	31	3.37	43.01
Acenaftileno (Ay)	C ₁₂ H ₈	152.20	95.0	270	---	---	0.89	---	---	---
Acenafteno (AE)	C ₁₂ H ₁₀	154.21	96.2	277	173	0.1980	0.30	3.8	4.00	12.17
Fluoreno (F)	C ₁₃ H ₁₀	166.20	116	295	188	0.1260	0.09	1.9	4.18	7.87
Fenantreno (PA)	C ₁₄ H ₁₀	178.20	101	339	199	0.1770	0.02	1.1	4.57	3.24
Antraceno (A)	C ₁₄ H ₁₀	178.20	216	340	197	0.0129	0.001	0.045	4.54	3.96
Pireno (P)	C ₁₆ H ₁₀	202.26	156	360	214	0.0506	0.0006	0.132	5.18	0.92
Fluoranteno (FI)	C ₁₆ H ₁₀	202.26	111	375	217	0.1410	1.2×10^{-3}	0.26	5.22	1.03
Criseno (CH)	C ₁₈ H ₁₂	228.30	255	448	179	0.0053	5.3×10^{-7}	---	1.64	5.86
Benzo(a)antraceno (BaA)	C ₁₈ H ₁₂	228.30	160	435	248	0.0462	2.8×10^{-5}	0.0482	5.91	0.58
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	C ₂₀ H ₁₂	252.32	168	481	268	0.0385	---	0.0015	5.80	---
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	C ₂₀ H ₁₂	252.32	217	481	268	0.0126	5.2×10^{-8}	0.0008	6.00	0.016
Benzo(a)pireno (BaP)	C ₂₀ H ₁₂	252.32	175	495	263	0.0328	7×10^{-7}	0.0038	6.04	0.046
Benzo(ghi)perileno (BP)	C ₂₂ H ₁₂	276.34	277	525	277	0.0032	---	2.6×10^{-4}	6.50	0.075
Dibenz(a,h)antraceno (DA)	C ₂₂ H ₁₄	278.36	270	524	300	0.0040 (a 267°C)	3.7×10^{-10}	0.0006	6.75	---
Indeno(1,2,3-cd)pireno (IP)	C ₂₂ H ₁₂	276.00	164	---	---	---	1.3×10^{-8}	5.3×10^{-4}	6.40	---

P.M. Peso molecular
P.F. Punto de fusión
P.E. Punto de ebullición
 V^M Volumen molar
F Proporción de fugacidad

p^S Presión de vapor
S Solubilidad en agua
Log K_{ow} Coeficiente de partición octanol/agua
H Constante de la ley de Henry

Los HAPs se producen a través de la combustión o pirólisis de la materia orgánica ya sea por procesos naturales o antropogénicos; también se producen muy pequeñas cantidades por diagénesis o biosíntesis (NRCC, 1983). Factores tales como el tipo y cantidad de combustible, temperatura y duración de la combustión y disponibilidad del oxígeno determinan la naturaleza y formación del HAP.

2.2. HAPs en el ambiente acuático.

Los HAPs entran al ambiente acuático a través de fenómenos naturales tales como incendios forestales, erupciones volcánicas, diagénesis y biosíntesis. Aunque los HAPs se encuentran en los derivados del carbón y petróleo, las actividades antropogénicas se consideran como la mayor fuente de liberación de HAPs al ambiente (Neff, 1979; NRCC, 1983; Sloff *et al.*, 1989).

La atmósfera es el principal medio de transporte de los HAPs y se desplazan a través de ella a grandes distancias, antes de su depositación al suelo o al agua. Una vez depositados, pueden ser absorbidos por las plantas, de donde suelen ser lavados por la lluvia, oxidados o depositados en el suelo como resultado de su muerte (Eisler, 1987; Lipiatou y Albaigés, 1994).

Al igual que en la atmósfera, los HAPs en la columna de agua se asocian generalmente a partículas (Wakeham *et al.*, 1980). La volatilización, la fotólisis, la hidrólisis, la biodegradación y la absorción al material particulado, seguida de su sedimentación, son los principales procesos que gobiernan la transferencia de los HAPs en el agua (NRCC, 1983; Eisler, 1987, Sloff *et al.*, 1989).

Los HAPs pueden ser biodegradados en el agua; el tiempo estimado que puede variar desde días (ej. naftaleno) hasta años (ej. pireno) bajo condiciones aerobias (U.S. EPA, 1990). En el agua también pueden ocurrir en menor grado procesos de foto-oxidación y oxidación biológica. Para la mayoría de los HAPs en la columna de agua, la sedimentación constituye el principal mecanismo de remoción (NRCC, 1983). De esta manera, los sedimentos son el reservorio ambiental final para los HAPs (Payne *et al.*, 1988) donde persisten y se transforman muy lentamente. No obstante, los sedimentos pueden ser resuspendidos parcialmente y después ser sujetos a procesos de transporte (Lorsen *et al.*, 1986). Los HAPs son removidos de los sedimentos principalmente

por procesos de volatilización y actividad microbiana. El grado de remoción varía en función de varios factores tales como la temperatura, el tipo de sedimento y la presencia de otros contaminantes (Wild *et al.*, 1991).

Estos contaminantes asociados al agua, sedimentos o material suspendido se encuentran disponibles a plantas y animales acuáticos. Dependiendo de la especie, los hidrocarburos del medio se acumulan en sus tejidos liposos; aun si los contaminantes se encuentran en bajas concentraciones (Metcalf y Carlton, 1990; Peña *et al.*, 1996).

2.3. Concentraciones de HAPs en los organismos acuáticos

Los HAPs están presentes en los tejidos de los organismos como mezclas complejas que son difíciles de caracterizar y medir (CEPA, 1994), debido a que se encuentran en muy bajas concentraciones (ng/g) y, generalmente, se hallan disponibles solamente pequeñas cantidades de material (algunos gramos).

Los estudios sobre los niveles de concentración de HAPs en los organismos estuarinos o marinos son pocos en comparación a los que se realizan en sedimentos. Las concentraciones reportadas, en los diferentes sistemas costeros mexicanos por diversos autores son altas del orden de $\mu\text{g/g}$ (Botello *et al.*, 1983, 1993, 1995; Álvarez *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 1995). El interés por monitorear la contaminación ambiental se ha incrementado en las dos últimas décadas. Las agencias gubernamentales e instituciones académicas han conducido numerosos estudios para documentar estos contaminantes en varias especies acuáticas en un esfuerzo por determinar la causa y efecto ligados a la presencia de estos compuestos y la observación de daños en el sistema (Crouch *et al.*, 1997).

Cabe señalar que la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en moluscos debido a su condición de organismos sedentarios y filtradores, empleados como bioindicadores de procesos de contaminación a nivel mundial (por ejemplo, en el programa "Mussel Watch" auspiciado por la Agencia de Protección Ambiental, en EUA y el RNO, Réseau National d'Observation en Francia).

También se han realizado estudios en otros recursos biológicos, como son peces y moluscos; ejemplificando el flujo de estos contaminantes a través de los diversos

eslabones de la cadena trófica. En general, los contaminantes se acumulan dependiendo de los diferentes factores que caractericen a cada uno de estos eslabones (ej. sexo, talla, hábitos alimenticios, ciclos reproductivos, bioquímica, etc.).

2.4. Metodología analítica para la determinación de HAPs

Para llevar a cabo los análisis, una muestra o una porción representativa de la misma, se prepara por métodos tradicionales de disolución, homogenización, extracción, filtración, concentración o evaporación, separación, derivatización química, estandarización (interna o externa), etc. Usualmente tales procedimientos son utilizados en combinación, los cuales forman un protocolo de preparación de la muestra.

Cualquier error introducido en algún punto de esta cadena se transfiere y añade errores en lo sucesivo. Durante la última década se han desarrollado diversas investigaciones con respecto a la extracción, identificación, cuantificación, evaluación estadística y presentación de los resultados (Colmsjö, 1998), incrementando el interés por buscar la simplificación y mejorar los procedimientos de preparación de muestras (tales como eliminar la transferencia y manipulación de la muestra; reducir a escala tanto como sea práctico, etc).

En la Tabla 2 se muestran los métodos que actualmente se utilizan para la determinación de hidrocarburos en organismos marinos. La mayoría de los métodos propuestos, de las dos últimas décadas, no contienen la suficiente información del análisis (detalles de los blancos, porcentajes de recuperación y resultados de los análisis por duplicado) que permita evaluar la precisión y exactitud de los resultados. Los resultados son reportados en peso seco o húmedo, aun cuando los valores expresados en peso seco permiten una mejor comparación de los resultados de HAPs en tejidos de las diferentes especies de organismos marinos.

La dificultad para comparar los diferentes estudios no consiste únicamente en la interpretación de los resultados de HAPs en diferentes organismos marinos, sino también reside en la cantidad y tipo de matriz empleada para la realización del

Tabla 2. Revisión de la metodología analítica propuesta para la determinación de hidrocarburos en organismos.

Método propuesto	Muestras	Procedimiento analítico												Referencias	
		Almacenamiento	Secado		Extracción		Purificación			Condiciones cromatográficas					
		Congelación	1	2	3	4	5	6	7	C.G.C.		Modo de inyección			
			DIF	DCE	8	9									
IOCARIBE, 1987	Peces (Sonda de Campeche) Camarones (Cajal, Matanzas y Minicón, Tabasco)														Botello, A.V., et al., 1983 González, et al., 1992
IOCARIBE, 1987	Almejas (Laguna Pom, Campeche) Ostiones (Laguna de Términos, Campeche)														Alvarez-Legorreta, et al., 1994
MacLeod et al., 1985	Ostiones (Golfo de México) Peces (Islas Canarias) Peces (sureste de Florida) Mejillón (Galicia, España)											EM			Jackson et al., 1994 Quintero, S. y Díaz, C., 1994 Snedaker, S.C., et al., 1994 Hermida-Ameijeira et al., 1995
Risebrough et al., 1983	Peces (Golfo Árabe) Almejas (Louisiana, E.U.A.) Camarones (Golfo de Arabia)														Al-Saad, H.T., 1996 DeLeon et al., 1996 Fayad et al., 1996
Law et al., 1988	Moluscos (Islas Canarias)											EM			Peña et al., 1996
GERG, 1992	Almejas (Laguna Pom-Atasta, Campeche)														Morales, 1998.
Baumard et al., 1997	Mejillones (costa mediterránea francesa)											EM			Baumard et al., 1998

1 Secado por liofilización
2 Secado con estufa de circulación de aire
3 Extracción por Soxhlet
4 Saponificación

5 Cromatografía en columna
6 Extracción en Fase Sólida
7 Cromatografía de líquidos de alta resolución
8 Modo de inyección con división

9 Modo de inyección sin división
C.G.C Cromatografía de gases capilar
DIF Detector de ionización de flama
DCE Detector de captura de electrones

análisis, los diferentes pasos en la metodología analítica para su determinación (extracción, purificación y separación de HAPs), así como el equipo y las técnicas de identificación y cuantificación.

En general, el pretratamiento antes del análisis cromatográfico es largo: extracción de HAPs, diversos pasos de purificación debido a la complejidad de estas matrices ambientales y pasos de preconcentración (Baumard *et al.*, 1997). Todos estos pasos permiten la pérdida total o parcial de los analitos de interés, por lo que es necesario validar el método que se empleará.

2.4.1 Extracción

Los HAPs de muestras ambientales sólidas tales como partículas de aire, suelos, sedimentos y tejidos biológicos son tradicionalmente extraídos por Soxhlet (Tabla 2) utilizando una variedad de disolventes orgánicos incluyendo acetona, benceno, tolueno, diclorometano, hexano, etc. Este tradicional método es eficiente para muchas muestras; sin embargo, implica grandes volúmenes de disolvente, largo tiempo de análisis, así como la incompleta recuperación de HAPs de alto peso molecular de materiales en los que son fuertemente absorbidos (ej. carbón o cenizas)(Peltonen y Kuljukka, 1995).

Ante la necesidad de técnicas eficientes de extracción, con alto rendimiento y recuperación, se han comparando diferentes métodos de extracción para los HAPs como: disolventes, ultrasonido, microondas, fluido supercrítico y fase sólida. Generalmente, este tipo de estudios se han realizado en muestras de suelos y sedimentos fortificados (Griest y Caton, 1983; Dean *et al.*, 1995; Colmsjö, 1998). Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas (Tabla 3), la selección del uso de cualquiera de ellos depende generalmente de la necesidad y disponibilidad de los equipos requeridos, así como también de factores tales como tiempo largo de proceso, eficiencia/costo y grado de complejidad en la operación de los mismos.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de extracción.

Técnica de extracción	Ventajas	Desventajas	Costo
Disolventes	- Bajo costo	- Extracción estática - Tiempos largos - Grandes volúmenes de disolvente - Produce grandes volúmenes del extracto	Bajo
Soxhlet	- Extracción dinámica - Alta producción - Bajo costo de inversión	- Tiempo de consumo - Grandes volúmenes de disolvente - Produce grandes volúmenes del extracto	Bajo
Ultrasonido	- Rápido	- Extracción estática - Difícil de controlar - Produce grandes volúmenes del extracto	Medio
Microondas	- Rápido - Consumo bajo de disolvente - Controlable	- Extracción estática	Medio-Alto
Fluidos supercríticos	- Rápido - Bajo consumo de disolvente - Controlable - Puede ser automatizado para la extracción de muchas muestras - Puede ser utilizado en línea, por ejemplo con CG	- Alto costo de inversión - Problemas de eficiencia en la recolección	Alto
Fase sólida	- Rápido - Bajo consumo de disolvente - Puede ser utilizado también para pre-separar	- Únicamente puede ser utilizado para HAPs disueltos - Pérdida posible de HAPs por absorción	Bajo

2.4.2 Concentración

El procedimiento de concentración es un paso en el que se debe poner atención, y mucho más cuando las pérdidas del analito de interés son considerables. En la mayoría de los trabajos se reporta el uso de concentradores tipo Kuderna-Danish y rotavapor. El uso del concentrador con columna Snyder se recomienda cuando se requiere reducir el volumen de la muestra a 1mL (Junk *et al.*, 1974) y, a diferencia del rotavapor, las pérdidas son menores. Junk y colaboradores también investigaron la reducción del volumen utilizando una corriente de nitrógeno u otro gas inerte. Los resultados mostraron que este método implica serias pérdidas del soluto, dado que el porcentaje de recuperación del método de destilación (Kuderna-Danish) es 5 a 7% mayor que el método de evaporación con corriente de nitrógeno.

2.4.3 Purificación

El procedimiento de purificación de los extractos orgánicos debe realizarse cuidadosamente, ya que es decisivo para la ejecución del análisis (Fuoco y Colombini, 1997). El principal objetivo de este procedimiento es eliminar o reducir, tanto como sea posible, cualquier otro compuesto que pueda interferir con la determinación de los analitos. La purificación y separación de los HAPs se realiza, en general, mediante cromatografía en columna (CC) (Tabla 2) con sílica gel, alúmina y florisil (los diferentes estudios difieren en las cantidades utilizadas y el estado de activación de cada una de ellas).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, siglas en inglés) también ha sido explorada para la eliminación de interferencias específicas en muestras de agua (Petrick *et al.*, 1988), sedimento (Jackson *et al.*, 1994) y tejidos biológicos (Baumard *et al.*, 1997).

A mediados de los años ochenta, la extracción en fase sólida (EFS) aparece como una innovación tecnológica y se presenta como una técnica alternativa en la purificación de muestras.

2.4.3.1 Extracción en fase sólida (EFS)

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica de extracción basada en la separación selectiva de uno o más componentes entre dos fases, una de las cuales es un absorbente sólido. La segunda fase generalmente es un líquido, pero también puede ser una emulsión, gas o un fluido supercrítico. En la EFS los analitos de interés tienen mayor afinidad hacia la fase sólida que por la matriz (paso de retención o adsorción). Los compuestos retenidos en la fase sólida son removidos en una etapa posterior por la elución con un disolvente de mayor afinidad para los analitos (paso de elución o desorción).

Los diferentes mecanismos de retención o elución se basan en las fuerzas intermoleculares entre el analito, los sitios activos en la superficie del absorbente y la fase líquida o matriz. Estos mecanismos son similares a los que operan en la Cromatografía Líquida (CL).

El procedimiento experimental consiste de cinco pasos (Figura 2):

1. Activación del absorbente pasando a través de él un disolvente apropiado que condicione la superficie del sólido.
2. Remoción del disolvente de activación con un líquido similar en composición a la matriz.
3. Aplicación de la muestra; los analitos serán retenidos por el absorbente (paso de adsorción o retención).
4. Remoción de los compuestos interferentes retenidos en el paso 3 con un disolvente el cual no remueva los analitos (paso de lavado).
5. Elución de analitos del adsorbente con un disolvente adecuado (paso de elución) y colección de los mismos para su posterior análisis.

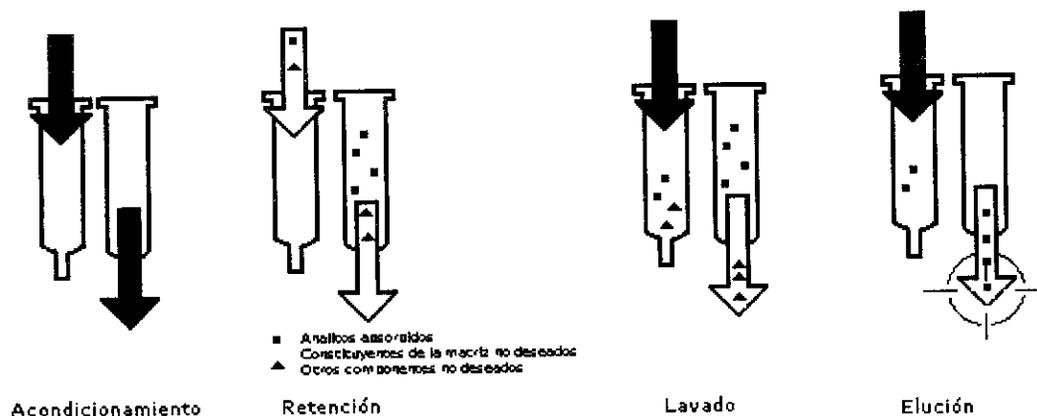


Figura 2. Procedimiento experimental en la extracción en fase sólida.

La separación efectiva dependerá de la elección apropiada del absorbente y disolventes eluyentes. Una serie de disolventes o mezclas de los mismos (series eluotrópicas) se utilizan para desorber selectivamente cada uno de los grupos de compuestos en una secuencia apropiada. La fuerza de elución es relativa y dependerá de la naturaleza de la fase sólida que se esté utilizando.

La variedad de absorbentes (fases sólidas), que se emplean son similares a aquellas utilizadas en HPLC, cada una ofrece una selectividad diferente. De acuerdo al carácter químico del grupo funcional unido a la silica o al copolímero, las fases resultantes son clasificadas como no polares, polares o intercambio iónico. La selección del mecanismo del absorbente se basa principalmente en los grupos funcionales presentes en el analito y la composición de la matriz. En la

actualidad, se dispone comercialmente de diferentes fases, entre las que se encuentran las que se enlistan en la tabla 4.

La EFS es una técnica que debido a sus ventajas sobre otras técnicas de preparación ha sido utilizada para el análisis de numerosos compuestos en una variedad de matrices. Actualmente, la EFS ha sido acoplada en línea con sistemas HPLC con diversos detectores (UV-visible, fluorescencia, electroquímicos, arreglo de diodos), con espectrómetros de masas y sistemas de Cromatografía de Gases Capilar (CGC).

Tabla 4. Absorbentes utilizados en la EFS.

Polaridad	Ejemplos de absorbentes	Grupo funcional del analito	Aplicaciones
No polar (Fase reversa)	C ₁₈ - octadecil C ₈ - octil C ₂ - etil CH - ciclohexil	Grupos hidrofóbicos: Anillos aromáticos Cadenas alquilo	Drogas y sus metabolitos Peptidos Pesticidas
Polar (Fase normal)	Cianopropil 2OH - Diol Si - Silica NH ₂ - Aminopropil	Grupos hidrofóbicos: Hidroxilos Aminas Heteroátomos (S, O, N)	Vitamina D Metabolitos Lípidos Separaciones de aditivos de aceite Carbohidratos Fenoles
Intercambio catiónico	SCX - Bencenosulfónico PRS ácido (fuerte) - Propilsulfónico CBA ácido (fuerte) - Ácido carboxílico (débil)	Cationes: Aminas Pirimidinas	Catecolaminas Herbicidas Fármacos
Intercambio aniónico	SAX - Amina cuaternaria PSA - Amina Primaria /Secundaria NH ₂ - Aminopropilo (débil) DEA - Dietilaminopropilo (débil)	Aniones: Ácidos carboxílico Ácidos sulfónico Fosfatos	Ácidos orgánicos Vitaminas

2.4.4 Análisis instrumental

La elección de la técnica instrumental depende de diversos factores, tales como las características fisico-químicas de los analitos, el límite de detección requerido, el nivel y el tipo de interferencia, la resolución que se necesita, la precisión y la exactitud de los instrumentos disponibles, el tiempo de análisis y el costo. Los análisis se realizan por medio de cromatografía de gases capilar (CGC) con detector de ionización de llama (Tabla 2). El gas acarreador empleado en cada uno de los diferentes estudios varía. Así mismo, las condiciones cromatográficas del horno, del inyector, del detector y el modo de inyección.

La cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas (CGC-EM) se presenta como una técnica eficiente que debe ser utilizada cuando sea posible para el análisis de compuestos orgánicos. La excelente resolución de la CGC, combinada con la sensibilidad e identificación de la EM, hacen posible determinar un analito en concentraciones trazas y ultratrazas en el extracto orgánico final (Vicenti, 1997).

En la actualidad, existen diversos métodos instrumentales para el análisis de los HAPs, dependiendo de la matriz en la que se encuentren contenidos. Muchos autores utilizan la separación de compuestos por cromatografía de gases capilar (CGC) con detector de ionización de llama (DIF), la cual provee un cromatograma general de los diversos HAPs, que pueden ser identificados y cuantificados. También se ha empleado la espectrofotometría infrarroja para el análisis de hidrocarburos alifáticos en matrices (Crompton, 1985) y de compuestos que contengan oxígeno proveniente del intemperismo químico y biológico de los componentes del petróleo (Hilmer y Bate, 1987). Algunos compuestos encontrados en el petróleo y sus productos de combustión exhiben un espectro UV-fluorescente característico, propiedad que ha sido utilizada de varias maneras para analizar tales componentes (notablemente HAP, tiofenos y sus derivados alquilados y productos degradados)(Smith y Maher, 1984; Crompton, 1985). El espectrofotómetro UV-fluorescente es de utilidad en los análisis cuantitativos, aunque la amplitud del espectro muestra una resolución limitada de los componentes. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) con detector fluorescencia es ampliamente usado para el análisis de HAPs y sus derivados en muestras de agua.

2.4.5 Identificación y cuantificación

Debido a la complejidad de las matrices, los procedimientos cromatográficos deben ser evaluados y optimizados utilizando soluciones estándar, y material de referencia certificada; el cual se utiliza para el control de la calidad analítica y cuantificación del analito. El tiempo de retención y el factor de respuesta para cada analito deben ser calculados utilizando uno o más estándares internos y la fortificación de las muestras reales para observar su respuesta. De la revisión realizada se encontró que la cuantificación de HAPs se realiza generalmente con un solo estándar (Alvarez *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 1995) o bien cada HAP es identificado con su respectivo estándar (Peña *et al.*, 1996; Morales, 1998). Por lo general, la estimación de las concentraciones de HAPs suele ser o sobreestimada o subestimada. Baumard y colaboradores (1997) realizaron un exhaustivo estudio en la elección de estándares internos que deben emplearse en este tipo de estudios.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Proponer y evaluar la extracción en fase sólida como procedimiento alternativo de purificación en la metodología analítica para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en organismos marinos.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar las condiciones óptimas para el análisis de HAPs en matrices fortificadas (tejidos de organismos marinos) utilizando la extracción en fase sólida, la cromatografía de gases capilar (CGC) y el sistema acoplado cromatografía de gases – espectroscopía de masas (CGC/EM).
- Comparar la metodología analítica en la que se utiliza cromatografía en columna y CGC con la metodología propuesta, en términos de su exactitud, precisión y recuperación.
- Determinar las concentraciones de HAPs en muestras de organismos marinos (pescado, camarón y ostión) de zonas contaminadas con la metodología propuesta.

4. METODOLOGÍA

4.1 Introducción

En la metodología analítica para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se han desarrollado diversas investigaciones con respecto a la extracción, identificación y cuantificación de estos compuestos (Comsjö, 1998; Poster *et al.*, 1998). Las matrices que se someten a estos análisis generalmente son: agua de mar, lluvia, sedimentos, suelos, partículas atmosféricas, tabaco, entre otras. Poco se ha realizado en matrices correspondientes a tejidos de organismos marinos (tales como peces, moluscos, crustáceos, etc), probablemente debido a que estas muestras contienen una gran cantidad de lípidos los cuales, debido a su gran afinidad con los HAPs, interfieren en los análisis (Christie, 1987; MacLeod *et al.*, 1988; Chu *et al.*, 1997). Generando la subestimación o sobreestimación de estos compuestos (Hellou, 1996; Crouch y Baker, 1997). Por ello, resulta importante proponer procedimientos de purificación alternativos al tradicional (cromatografía en columna), que contribuyan a la determinación real de los niveles de contaminación en dichos organismos.

4.2 Conservación y almacenamiento de la muestra

Una vez recolectados los organismos marinos se lavaron con agua dulce y envolvieron en papel aluminio, debidamente etiquetados y congelados a -4°C (GERG, 1992). Las muestras se transportaron congeladas al laboratorio y se almacenaron en la oscuridad a -4°C hasta la realización de los análisis.

4.3 Limpieza del material

Todo el material de cristalería se lavó con detergente libre de fosfatos (Extrán), se enjuagó con agua destilada, y se secó en la estufa a 100°C . Esto último puede ser sustituido por enjuagues de acetona seguido por cloruro de metileno (Futoma *et al.*, 1981; GERG, 1992). Después de secar y dejar enfriar el material, éste se tapó con papel aluminio y guardó en una gabeta limpia para prevenir su contaminación.

4.3.1 Material

Vasos de precipitado (100, 250 y 500mL)
Pipetas graduadas (1, 2 y 3mL)
Pipetas Pasteur de vidrio (1 mL)
Buretas (10, 50 y 100mL)
Frascos de vidrio con tapón de rosca (150mL)
Viales de vidrio con tapón de rosca (\approx 20mL)
Matraces volumétricos (10 y 100mL)
Embudos de separación (250mL)
Mortero y pistilo de porcelana
Equipo Soxhlet (matraz de 100mL, extractor y condensador)
Concentrador tipo Kuderna-Danish (tubo concentrador graduado, matraz de 250mL y columna Snyder con 3 bolas)
Columna cromatográfica de vidrio (300 x 10mm d.i) con llave de teflón
Balanza analítica (sensibilidad de 0.01mg) Mettler H54AR
Baño María Büchi B-480
Rotavapor Büchi R-114
Jeringas (10, 100 y 500 μ L)
Liofilizadora LabConco 5
Frascos de vidrio (1L)
Papel aluminio
Cartuchos de papel filtro (7 x 8 cm)

4.4 Soluciones y reactivos

Agua destilada.

Hexano 99% (GC, grado cromatográfico) de Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA;
Pentano (RA, reactivo analítico) de Merck, Darmstadt, Alemania; Metanol (RA),
Tolueno (RA), Cloruro de metileno (RA) de Mallinckrodt, J.t. Baker, México;
Benceno (RA) de E. Merck, México.

Fibra de vidrio silanizada de Alltech.

Solución de hidróxido de potasio (KOH) al 20% (v/w) en metanol.

Sulfato de sodio granular (Na_2SO_4) anhidrido de Mallinckrodt, J.T. Baker, México. Secar a 350°C por 6 horas.

Oxido de aluminio 90 (Al_2O_3) (GC) (tamaño de partícula de 0.063 - 0.200mm). Secar a 350°C por 6 horas y antes de ser utilizada desactivarla parcialmente con el 1% de agua destilada (v/w).

Silica gel 60 ($\text{SiO}_2\text{-xH}_2\text{O}$) (GC) (tamaño de partícula 0.063 - 0.200mm). Secar a 150°C por toda la noche (≈ 14 horas) y antes de ser utilizada desactivarla parcialmente con el 3% de agua destilada (v/w).

Cobre granular (GA). Se activa por calentamiento con HCl concentrado y enjuagar 3 veces con agua destilada y cloruro de metileno.

Cartuchos EFS LC-NH₂ Supelclean (500mg/3mL) de Supelco, Park, Bellefonte, EUA.

Cartuchos EFS Silica-gel Spe-ed (500mg/3mL) de Applied Separations, Leningh Valley, EUA.

Solución estándar 1. Solución estándar de una mezcla de 3 hidrocarburos aromáticos policíclicos. Se disolvieron 0.00308g de Fenantreno (PA), 0.00221g de Pireno (P) y 0.00199g de Criseno (CH) en hexano (HPLC). Se colocó en el ultrasonido para lograr su completa disolución. Se aforo a 10mL con hexano (GC). Los cristales de los HAPs utilizados no eran 100% químicamente puros (PA: 99%, P: 98.5% y CH: 98% de Chem. Service Co., Wester Chester, EUA).

Solución estándar 2. Solución estándar de una mezcla de hidrocarburos aromáticos policíclicos (16 HAPs, 2000mg/L en cloruro de metileno-benceno [50:50]) de Chem. Service Co., Western Chester, EUA. Las abreviaturas utilizadas para los HAPs son: Naftaleno (NA), Acenaftileno(Ay), Acenafteno (AE), Fluoreno (F), Fenantreno (PA), Antraceno (A), Fluoranteno (FI), Pireno (P), Benzo(a)antraceno (BaA), Criseno (CH), Benzo(b)fluoranteno (BbF), Benzo(k)fluoranteno (BkF), Benzo(a)pireno (BaP), Indeno[1,2,3-cd]pireno (IP), Dibenzo(a,h)antraceno (DA) y Benzo(ghi)perileno (BP).

Solución estándar 3. Se disolvieron 0.25 μ L de la solución estándar 2 en 2mL de tolueno.

4.5 Material biológico

En la tabla 5 se muestran los detalles de las muestras analizadas.

Tabla 5. Descripción del material biológico.

Organismo	No. de individuos	Lugar de adquisición	Descripción
Pescado	1	Supermercado	Adquirido como filete. Peso húmedo 65.9982g
Camarón	8	Supermercado	Peso húmedo (sin exoesqueleto) 79.7g
Ostión	25	Supermercado	Peso húmedo 111.97g
Pescado Fam. Mucrouridae	1	Boca del Río Coatzacoalcos, Veracruz	Long.total 37cm Peso húmedo 178.9g (66.3g de músculo)
Camarón (<i>Penaeus duorarum</i>)	21	Laguna de Términos, Campeche	Peso húmedo total 130.5g (sin exosqueleto)

4.6 Condiciones cromatográficas

Cromatógrafo de gases capilar Hewlett-Packard modelo 5890 serie II Plus equipado con un sistema de inyección en columna, control electrónico de presión y detector de ionización de flama. Los análisis se llevaron a cabo en una columna capilar de silica fundida PTE™-5 (30m x 0.25mm d.i. x 0.25 μ m de grosor de película). La temperatura del detector fue de 320°C y la del inyector se programó para que estuviera a 3°C arriba de la temperatura del horno. La temperatura del horno se programó para que iniciará a 60°C (1min) incrementándose a 20°C/min hasta alcanzar 250°C, después a 320°C a una velocidad de 5°C/min y se mantuvo así por 10 minutos. Se utilizó hidrógeno como gas acarreador a un flujo constante (2mL/min).

Para el análisis por cromatografía de gases capilar-espectroscopía de masas (CGC/EM) se utilizó un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard modelo 5890

serie II Plus) equipado con un sistema de inyección split/splitless (tiempo de splitless: 2min). La temperatura del inyector se mantuvo a 250°C. El programa de temperatura fue: 60°C (1min) a 15°C/min hasta 300°C (20min). El gas acarreador fue helio. La columna capilar utilizada fue JW & Scientific DB5 (30m x 0.25mm d.i. x 0.25µm de grosor de película). El CGC se acopló a un detector de masas selectivo (DMS)(Hewlett-Packard modelo 5971). La temperatura de la línea de transferencia fue 280°C. Los análisis se realizaron por ionización por impacto electrónico (70eV). Se utilizó el modo de barrido total del espectro (SCAN) y modo selectivo de iones (SIM, siglas en inglés). En los análisis por SCAN la señal fue registrada de 50 a 550 m/z a 1.5scan.s⁻¹. Cuando se utilizaba el modo SIM las señales que se adquirieron fueron el ion molecular y 2 iones secundarios de cada compuesto (2.8 ciclos.s⁻¹).

4.7 Procedimiento

4.7.1 Preparación de la muestra

En la figura 3 se muestra el esquema analítico propuesto para la preparación de la muestra y se describen los detalles de cada uno de los pasos a seguir.

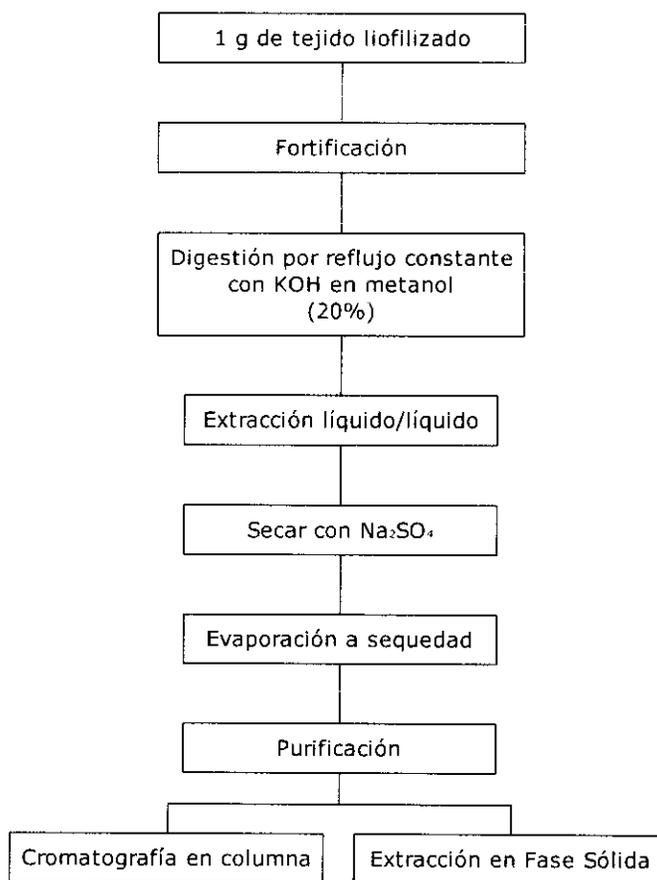


Figura 3. Preparación de la muestra.

4.7.1.1 Liofilización

La muestra se descongeló y lavó con abundante agua destilada. Se eliminaron, dependiendo de la muestra, escamas, piel, exosqueleto, valvas, etc. Se cortó finamente, pesó y colocó en el vaso de la liofilizadora. Se congeló con hielo seco. Se liofiliza de 24 a 48 horas, dependiendo de la matriz. Una vez que se liofilizó se volvió a pesar para obtener el porcentaje de humedad. Después se homogenizó con la ayuda de un mortero y pistilo hasta lograr un polvo muy fino. Se peso 1g del tejido liofilizado y se colocó en un cartucho de papel filtro, para su extracción.

4.7.1.2 Fortificación

Se adicionaron 25 μ L de la solución estándar 2 (*ver inciso 4.4*) a un gramo de tejido de pescado liofilizado, antes de realizar la extracción. El vial que contenía la solución estándar se almacenó en el refrigerador (T = -4°C) y el volumen del vial se determinó antes y después de tomar la alícuota correspondiente (revisando cualquier alteración de la solución por evaporación).

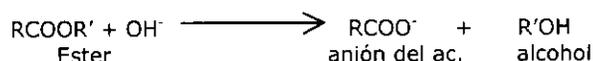
4.7.1.3 Saponificación y extracción líquido/líquido

Se realizó la saponificación¹ de la muestra por 4 horas a 60°C bajo reflujo con una solución metanólica de KOH al 20% (w/v) en un equipo Soxhlet. Después de enfriarse, la digestión se decantó a un embudo de separación, se agregó 1mL de agua destilada y se agitó vigorosamente. Se adicionaron 25mL de hexano, se agitó el embudo y cuando las fases se separaron se recolectó la fase de hexano en un frasco de vidrio ámbar. La extracción líquido/líquido se realizó 3 veces y todas las fases de hexano se recolectaron en el mismo frasco. El extracto de hexano se secó con Na₂SO₄ granular y fibra de vidrio silanizada. Se transfirió a un matraz de bola, y este se colocó en el rotavapor. Se lavó el frasco que contenía el extracto con 2mL de hexano y se transfirió al matraz de bola. Se evaporó a sequedad. En seguida, se disolvió con 2mL de hexano grado cromatográfico. La purificación del extracto se llevó a cabo por cromatografía en columna y extracción en fase sólida (EFS).

4.7.2 Purificación por cromatografía en columna

Las muestras biológicas contienen generalmente cantidades a nivel de traza de HAPs, además de compuestos que pueden interferir; como los lípidos, siendo éstos los de mayor importancia, es por ello que los procedimientos de

¹ Los ésteres son muy frecuentes en la naturaleza. Las grasas animales y los aceites vegetales son un ejemplo de mezclas de ésteres. Cuando se hierven con hidróxido sódico, se lleva a cabo una saponificación. En la cual, se descompone la molécula de los ésteres (grasas) en un polialcohol y una sal de ácido esteárico (estearato sódico, NaOCC₁₇H₃₅ y jabón). La ecuación general de la saponificación se describe de la siguiente manera:



El jabón es notable porque origina aniones constituidos esencialmente por un hidrocarburo modificado en un extremo por el grupo negativamente cargado -COO⁻. Al adicionar agua no se disuelven los aniones, porque los hidrocarburos son insolubles en los disolventes polares. Se forman micelas. Las cargas negativas superficiales de las micelas se disuelven en agua, mientras que las cadenas interiores de los hidrocarburos se disuelven unas en otras.

concentración y purificación son usualmente necesarios antes del análisis cromatográfico.

La purificación del extracto se llevó a cabo en una columna de vidrio. La columna se empacó de la siguiente manera: se colocó un tapón de fibra de vidrio silanizado en el fondo de la columna. Se adicionaron $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y Al_2O_3 en una proporción 1:4 (v/v). Para empacar adecuadamente la columna se realizó una suspensión (slurry) con hexano. Se permitió que el $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y la Al_2O_3 se asentaran. Después se adicionaron 1g de Na_2SO_4 ² anhidrido y 1g cobre activado. La columna se lavó eluyendo con 30mL de hexano, el cual se desechó.

El extracto se colocó en la columna. Se enjuagó el vial que contenía la muestra con 2mL de hexano y se vertió inmediatamente en la columna. Después se eluyó la fracción alifática con 100mL de hexano y la fracción aromática se eluyó con 100mL de benceno, a una velocidad de flujo de aproximadamente 2mL/min.

Cada fracción se colectó separadamente y se evaporó con rotavapor cuidadosamente a sequedad. El residuo se redisolvió con 2mL de hexano, y 1 μ L de cada fracción se inyectó en el cromatógrafo (Figura 4).

² Se utiliza generalmente para remover pequeñas cantidades de agua en el extracto de la muestra, por lo general se colocan 3cm de sulfato de sodio anhidrido para asegurarse de que el eluato en la columna este seco, evitando con ello interferencias en el proceso de separación de los compuestos.

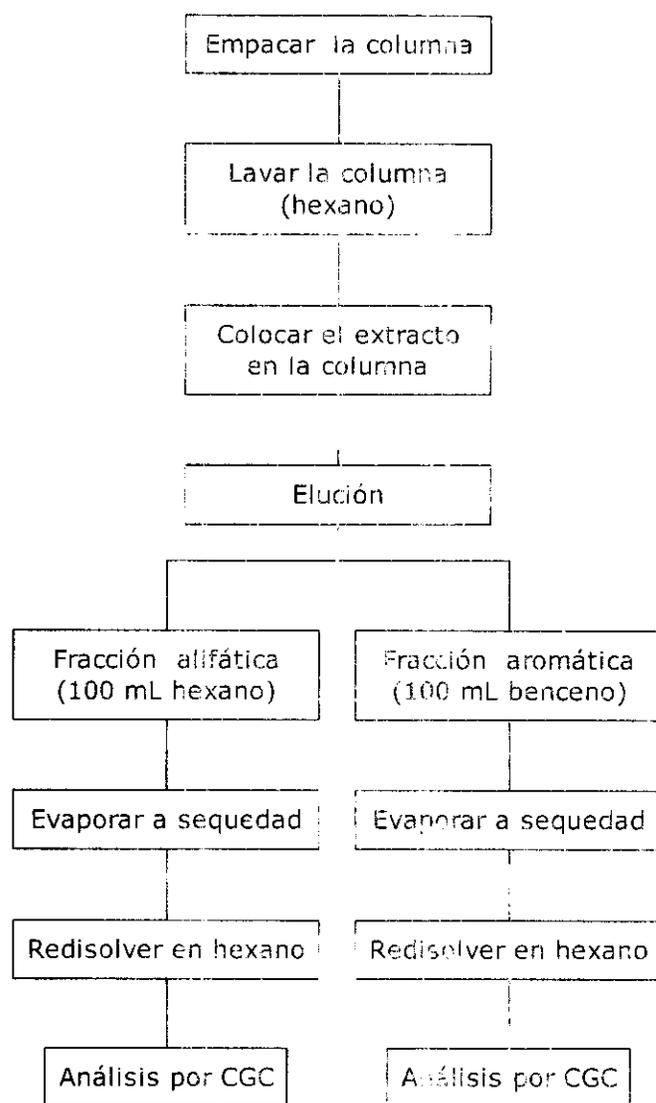


Figura 4. Esquema del procedimiento de purificación por cromatografía en columna.

4.7.3 Purificación por extracción en fase sólida

Para realizar la purificación de las muestras por EFS se propuso emplear cartuchos de aminopropil (LC-NH₂) y silica gel (LC-Silica), éstos se eligieron por los siguientes argumentos:

La fase sólida de aminopropil³ permite la separación de HAPs basándose en el número de anillos condensados por la adición de grupos alquilo a los anillos

³ Es una fase estacionaria altamente polar con un enlace químico aminopropilsilano a partículas de silica. La superficie básica de este absorbente lo hace útil para la separación de compuestos polares. Con los absorbentes clásicos, la adición de grupos alquilo a un anillo aromático generalmente incrementa la retención del

aromáticos. En la fase normal con NH_2 la retención de los analitos se basa principalmente en la interacción entre los electrones π de los HAPs y el grupo polar amino de la fase estacionaria. La adición de los sustituyentes a los anillos aromáticos afecta al sistema de electrones π ligeramente, la sustitución alquilo también afecta la retención en el absorbente (Wise *et al.*, 1977).

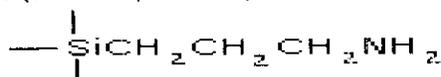
Se ha reportado que la fase sólida de silica gel⁴ permite la remoción de esteroides y la recolecta libre de una fracción aromática libre de hidrocarburos alifáticos (Baumard, *et al.*, 1997). Esta fase absorbe compuestos alifáticos, aromáticos o moléculas amino secundarias, terciarias, cetonas y éteres generalmente, por enlaces de hidrógeno, donde el soluto funciona como un donador de electrones. La silica se prefiere sobre la alumina para la separación de mezclas de HAPs por sus coeficientes de adsorción que cubren un amplio intervalo (Futoma *et al.*, 1981).

4.7.3.1 Acondicionamiento de los cartuchos de EFS y elución de los analitos

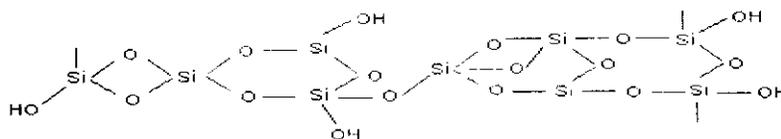
Ambos cartuchos se acondicionaron antes de ser utilizados, esto se realiza para solvatar las moléculas del absorbente y de esta forma hay mejor interacción con los analitos que se requiere retener (Berrueta *et al.*, 1995). Para acondicionarlos

compuesto. En contraste, cuando se utiliza el absorbente NH_2 la presencia de un grupo alquilo en el HAP tiene un efecto ligero en la retención. El uso de este material elimina uno de las mayores dificultades encontradas con los absorbentes clásicos, ej. la retención no es reproducible debido a pequeños cambios en el contenido de humedad del eluyente.

⁴En la silica se presentan grupos hidroxilos ácidos en la superficie, la silica se clasifica como un absorbente de segundo tipo por tener enlaces de hidrógeno con moléculas con densidades de electrones concentradas en su periferia (incluye moléculas con electrones p y pares de electrones solos tales como hidrocarburos no saturados, aminas terciarias, cetonas y éteres) y sustancias que posean enlaces vecinos unidos con carga positiva concentrada en la periferia del otro (alcoholes primarios y aminas secundarias).



De acuerdo con el contenido variante de agua de la silica (entre 2 y 10% w/w), su fórmula universal se escribe como $(\text{SiO}_2)_n \cdot \text{H}_2\text{O}$. El agua puede ser removida por el tratamiento térmico a 100 – 200°C bajo vacío, permitiendo un incremento en la actividad superficial. Las elevadas temperaturas causan una deshidroxilación de grupos hidroxilos en los grupos de siloxano, siendo este último incapaz de interacciones específicas más fuertes. La concentración de los grupos hidroxil en la superficie y dentro del volumen de las partículas depende de la naturaleza y la estructura cristalina de la silica y su pretratamiento.



se utilizaron sucesivamente 2mL de hexano, 2mL de cloruro de metileno y 2mL de hexano. Se recolectaron en un vial dichos disolventes y se desecharon. El extracto ($\approx 500\mu\text{L}$) se colocó cuidadosamente con una jeringa en el cartucho. El flujo utilizado durante el acondicionamiento y la elución fue de aproximadamente 0.2mL/min. Se eluyeron 2 fracciones; la primera fracción se eluyó con 2mL de pentano (fracción alifática) y la segunda fracción con 3mL de tolueno (fracción aromática). Cada fracción se recolectó por separado. El volumen final de cada fracción se aforó a 2mL y se inyectó $1\mu\text{L}$ de cada fracción en el cromatógrafo. El esquema de este procedimiento se muestra en la figura 5.

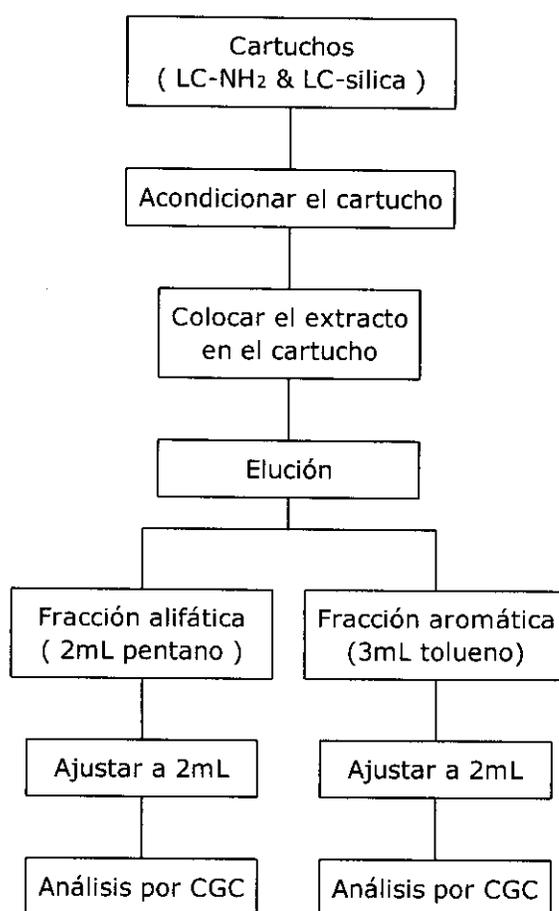


Figura 5. Esquema del procedimiento de purificación por extracción en fase sólida.

4.8 Identificación y cuantificación de HAPs

Cada muestra se preparó 3 veces y cada fracción obtenida se inyectó 3 veces en el cromatógrafo. Se realizó el análisis de una muestra sin fortificar para reconocer los analitos presentes en la muestra (blanco de matriz). Así como también se analizó un blanco de reactivos para verificar posibles fuentes de contaminación e interferencia.

La identificación de los HAPs se realizó comparando su tiempo de retención contra un estándar externo. Los HAPs fueron cuantificados por el factor de respuesta de los diferentes compuestos, los cuales fueron calculados inyectando la solución estándar 3 (la solución contenía la misma concentración que la utilizada para la fortificación del tejido de pescado).

Para confirmar la presencia de los HAPs se inyectaron las muestras en el sistema de CGC/EM en modo SCAN y SIM. Para calcular la precisión y exactitud se prepararon 3 extractos independientes inyectando 3 veces cada uno de las fracciones obtenidas. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar en $\mu\text{g/g}$ (peso seco).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Los dos pasos más críticos en el análisis de HAPs en muestras biológicas son: la extracción de los HAPs y la purificación del extracto. Los métodos de digestión y extracción líquido / líquido después de la saponificación han sido utilizados principalmente para la determinación de HAPs en matrices tales como las muestras de tejido biológico. Debido a la complejidad de estas matrices en ocasiones se requieren varios pasos de purificación y preconcentración, los cuales podrían ocasionar la pérdida parcial o total de los analitos de interés (Baumard *et al.*, 1997).

Es por ello, se propone un procedimiento alternativo de purificación, Extracción en Fase Sólida (EFS), y se compara con el método tradicional por cromatografía en columna.

5.1 Procedimiento de purificación por cromatografía en columna.

Para la elección de la metodología analítica se comenzó con la revisión bibliográfica de los diferentes métodos que actualmente se emplean en la determinación de estos compuestos en organismos marinos (Tabla 2). En la actualidad, en México se utilizan 2 métodos: IOCARIBE (1987) y el propuesto por GERG (1992). El primero consiste en saponificar la matriz seguido por una extracción líquido / líquido y la remoción de interferencias se realiza por cromatografía en columna (*ver inciso 4.7.2*). El método descrito por GERG (1992) consiste en la extracción de la matriz en equipo Soxhlet con cloruro de metileno seguido de la purificación por cromatografía en columna. A diferencia con el método anterior, en este no se lleva a cabo la saponificación y con lo que respecta a la purificación de la muestra las fracciones alifática y aromática se recolectan juntas. El tiempo estimado de ambos protocolos varía de 13 a 15 horas. Se probaron ambos métodos, obteniendo resultados insatisfactorios.

Los diferentes pasos de la metodología analítica para la determinación de HAPs como: extracción, saponificación, concentración y purificación por cromatografía en columna que se utilizaron en el presente estudio fueron los reportados por IOCARIBE (1987) y no se realizó modificación alguna.

5.2 Procedimiento de purificación por Extracción en Fase Sólida (EFS).

Se eligió el método de extracción y saponificación para tejidos biológicos propuesto por IOCARIBE (1987), con el propósito de realizar este paso igual que para la purificación por cromatografía en columna. Posteriormente, se procedió a desarrollar y optimizar el procedimiento de purificación por EFS utilizándose cartuchos comerciales de aminopropil (LC-NH₂) y silica gel (LC-Silica).

Considerando la información reportada para sedimentos marinos en el uso y acondicionamiento de los cartuchos por Macías (1996), se procedió a realizar la purificación bajo esas condiciones, no obteniendo resultados satisfactorios. Es decir, se reportaban resultados utilizando cartuchos comerciales de silica gel (material empacado 0.5g) y se eluían tres fracciones: la primera de ellas con pentano donde se esperaba la mayoría de los alcanos, una segunda la cual era eluida con una mezcla de pentano:tolueno (70:30) en donde se recuperarían alcanos y la mezcla compleja no resuelta (UCM, siglas en inglés) y una tercera fracción, la cual contuviera la mayoría de los HAPs. No se observó una separación selectiva de los diferentes compuestos al seguir la metodología propuesta y no se obtuvieron fracciones puras, libres de interferencias. Además por el volumen utilizado en la elución, éste debía ser concentrado.

Después de una exhaustiva revisión bibliográfica para la determinación de HAPs en diferentes matrices se observó que los disolventes más utilizados, para eluir las diferentes fracciones durante la purificación por cromatografía en columna, eran pentano y hexano para eluir la fracción alifática, y benceno, tolueno y cloruro de metileno para eluir la fracción aromática. La proporción de los disolventes utilizados variaba de acuerdo al procedimiento analítico que se seguía en cada uno de los diferentes estudios. Por lo que se propusieron diferentes disolventes para la elución, los cuales se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Disolventes para la EFS (LC-NH₂ y LC-Silica).

Propuesta	Disolvente (fracción alifática)	Disolvente (fracción aromática)
1	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₆
2	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ : CH ₂ Cl ₂ (7:3)
3	C ₅ H ₁₂	C ₆ H ₅ -CH ₃
4	C ₅ H ₁₂	C ₅ H ₁₂ : CH ₂ Cl ₂ (7:3)

Para la realización de este procedimiento se utilizaron 400 μ L de la solución estándar 1 (*ver inciso 4.4*) en cada una de las pruebas que se llevaron a cabo. Los HAPs fueron disueltos con hexano grado HPLC.

Para comprobar la pérdida del estándar mientras se colocaba éste en el cartucho se recolectó dicha fracción y se inyectó en el cromatógrafo (*ver inciso 4.6*). En ninguno de los casos hubo pérdida del estándar en este paso. Después se eluyeron con 2mL del disolvente en estudio para obtener la fracción alifática. Posteriormente, se procedió a eluir la fracción aromática con 2 mL del disolvente de prueba y, para comprobar la completa elución de esta fracción, se eluyó 1mL más del mismo disolvente. Al inyectar este último mililitro en el cromatógrafo se observó que se seguían eluyendo los analitos en estudio. Cada propuesta se realizó dos veces. En la segunda ocasión, se disminuyó la velocidad de flujo, se eluyó la fracción alifática con 2mL, la fracción aromática con 3mL, y se adicionó 1mL más del mismo disolvente propuesto a la fracción aromática para comprobar la totalidad de la elución de los analitos. Cada una de las fracciones se inyectó en el cromatógrafo. Se observó que era suficiente eluir la fracción aromática con 3mL del disolvente en estudio. También se advirtió que era importante disminuir el flujo de elución a $\approx 0.2\text{mL}/\text{min}$ y de esta manera los compuestos aromáticos serían recolectados en la fracción correspondiente. Analizando los resultados se decidió utilizar 2mL de pentano para eluir la fracción alifática y 3mL de tolueno para eluir la fracción aromática. Se prefirió utilizar pentano sobre el hexano debido a que cuando se utilizaba este último algunos HAPs eran eluidos, a pesar de que ambos disolventes tienen polaridades similares y el pentano es más volátil.

El volumen de inyección en todos los casos fue de 1.0 μ L. Durante la elección y optimización de los disolventes a utilizar, las condiciones cromatográficas con las cuales se comenzó fueron: 60°C (1 min) a 20°C/min hasta 320°C (20 min). La temperatura del inyector se mantuvo 3°C arriba de la temperatura del horno. La temperatura del detector fue de 320°C.

5.3 Optimización de las condiciones cromatográficas.

Después de la optimización del eluyente y del volumen de elución a emplear (*ver inciso 5.2*). Se procedió a mejorar la resolución entre el Benzo(a)antraceno con el Criseno, el Benzo(b)fluoranteno con el Benzo(k)fluoranteno y el Indeno(1,2,3-cd)pireno con el Dibenzo(a,h)antraceno. Proponiéndose los siguientes programas de temperatura (Tabla 7).

Tabla 7. Programas de temperatura propuestos.

Programa	Temp. Inicial (°C)	Tiempo (min)	Velocidad (°C/min)	Temp. Final 1 (°C)	Velocidad (°C/min)	Temp.final 2 (°C/min)	Tiempo (min)
1	60	1	20	320	---	---	20
2	60	1	15	320	---	---	20
3	60	1	10	320	---	---	20
4	60	1	20	250	8	320	10
5	60	1	20	250	5	320	10

Después de probar cada uno de estos programas se eligió el programa 5 ya que mejoró la resolución de los HAPs, inyectándose seis veces la solución estándar 2 (25µg/mL). Con las áreas obtenidas se calculo el factor de respuesta, el cual se utilizó para determinar la repetibilidad de inyección, obteniéndose un coeficiente de variación de 0.05. Los factores de respuesta se utilizaron para el análisis cuantitativo.

5.4 Recuperación de la solución estándar de HAPs en EFS.

Con las condiciones elegidas y optimizadas se determinó el porcentaje de recuperación de los 16 HAPs en estudio utilizando cartuchos de aminopropil (LC-NH₂), adicionando 400µL de una solución estándar de aproximadamente 1 ppm y posteriormente una solución estándar de 0.1 ppm. En la figura 6 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos con el estándar correspondiente.

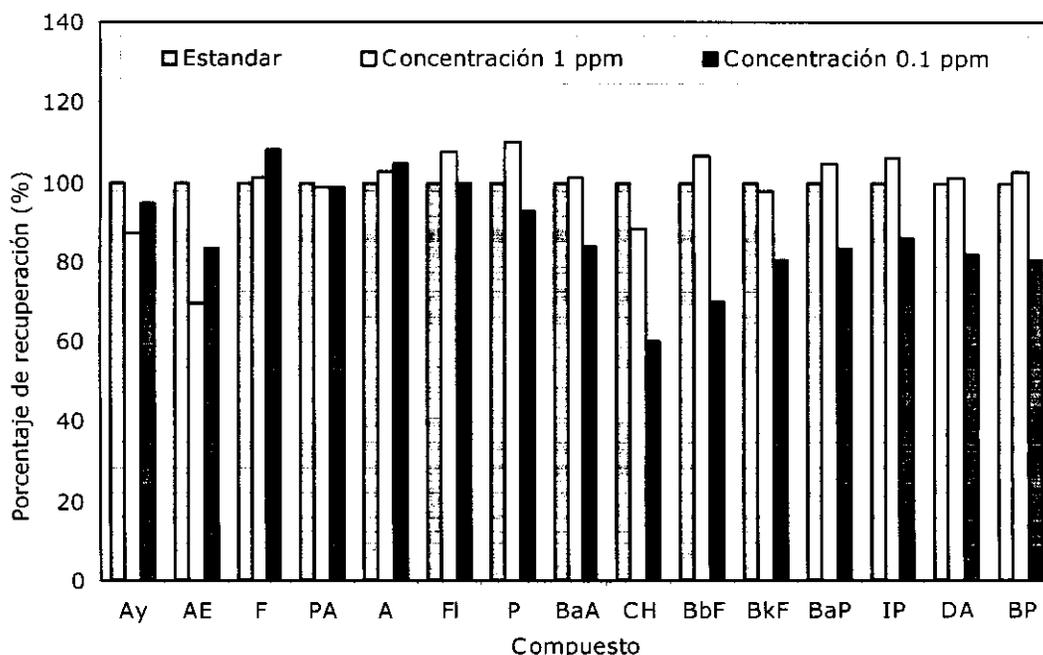


Figura 6. Porcentaje de recuperación del estándar (concentraciones de 1ppm y 0.1ppm) en cartuchos de aminopropil (LC-NH₂).

Se puede observar que el porcentaje de recuperación de HAPs para concentraciones de 1ppm es de 99.08 ± 10.43 , sin embargo, el Acenaftileno (87.20%) y Acenafteno (69.33%) mostraron un porcentaje de recuperación menor en comparación con el resto de los HAPs. El porcentaje de recuperación promedio para concentraciones de 0.1ppm es de 87.22 ± 12.90 . Observando que la pérdida de HAPs durante el proceso de purificación es relativamente baja.

5.5 Estandarización del método analítico con tejido de pescado fortificado.

Para este estudio se utilizó tejido de pescado fortificado (ver inciso 4.7.1.2). Se compararon los resultados obtenidos por el procedimiento de purificación mediante columna cromatográfica y EFS utilizando aminopropil y silica gel como fase estacionaria.

5.5.1 Análisis de la fracción alifática.

La purificación del extracto de pescado por cromatografía en columna se efectuó siguiendo las condiciones recomendadas en la literatura (IOCARIBE, 1987). Se eluyeron dos fracciones: la primera se eluyó con hexano, donde se recolectó la fracción alifática, y la segunda fracción se eluyó con benceno, conteniendo los HAPs. Como se muestra en la figura 7a, los hidrocarburos alifáticos se eluyeron junto con algunos HAPs de bajo peso molecular (dos y tres anillos), también se identificó escualeno (éste fue identificado por CGC/EM).

Las figuras 7b y 7c muestran la fracción alifática de la purificación con aminopropil (LC-NH₂) y silica gel (LC-Silica) que se obtiene del extracto de pescado fortificado. Como se observa en los cromatogramas, la EFS permite una mejor purificación si se compara con la obtenida por cromatografía en columna. En la figura 7b se muestra el cromatograma de la fracción alifática del extracto de pescado purificado con cartuchos de aminopropil. Los picos de los hidrocarburos alifáticos son mayores si los comparamos con los picos de los cromatogramas de las figuras 7a y 7c, lo que indica que con el absorbente LC-NH₂ los hidrocarburos alifáticos no son retenidos en la fase estacionaria.

Al realizar la purificación con cartuchos de silica gel se observó un perfil típico de aceite mineral (Figura 7c); sin embargo, los HAPs de bajo peso molecular (tales como Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno y Antraceno) también se eluyeron en esta fracción.

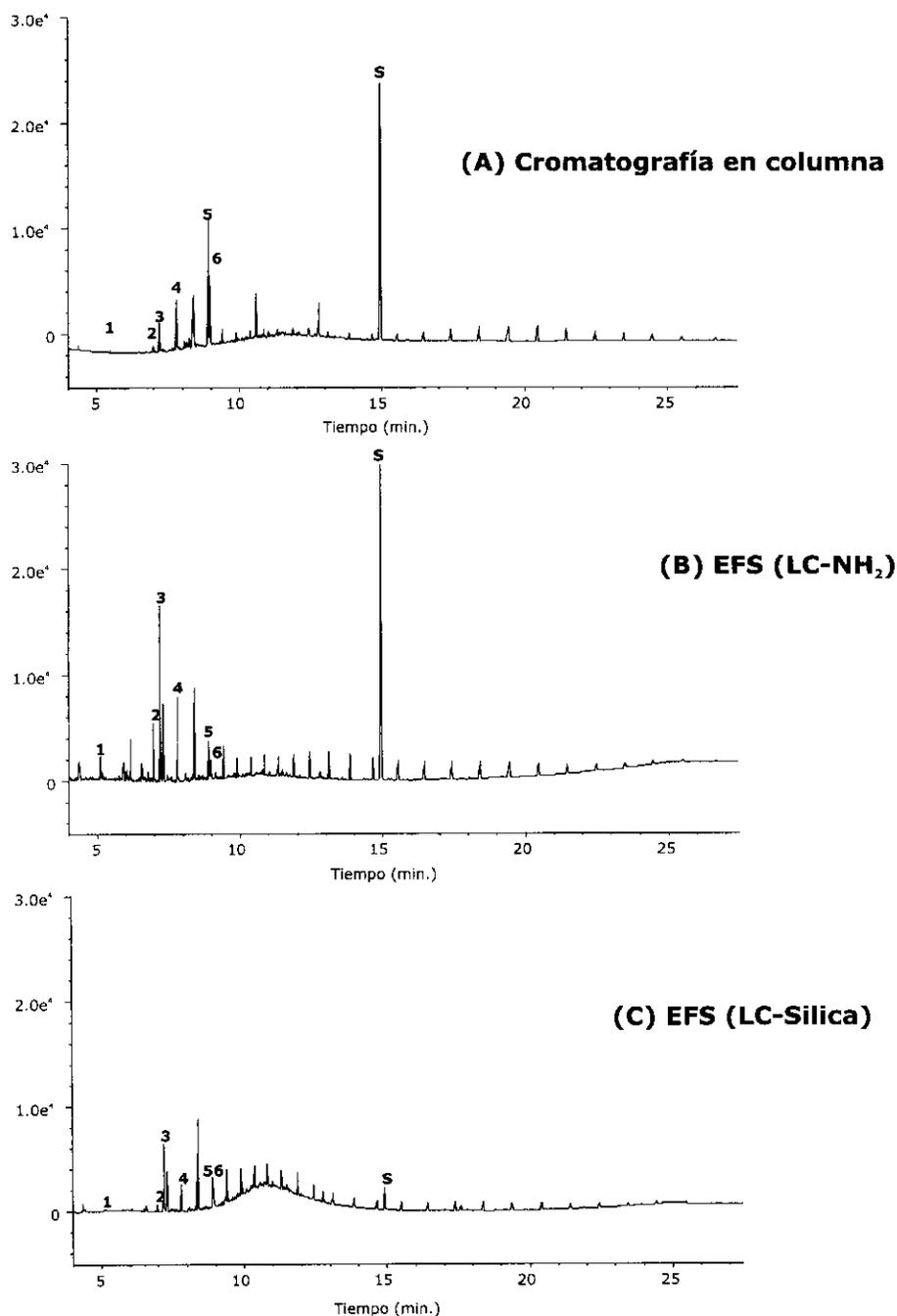


Figura 7. Cromatogramas de la fracción alifática del extracto de pescado fortificado y purificado por (a) Cromatografía en columna, (b) EFS (LC-NH₂) y (c) EFS (LC-Silica). Identificación: **S.** Escualeno, **Phe.** Fenoles, **Pt.** Ftalatos, **U.** Desconocido, **1.** Naftaleno, **2.** Acenaftileno, **3.** Acenafteno, **4.** Fluoreno, **5.** Fenantreno, **6.** Antraceno, **7.** Fluoranteno, **8.** Pireno, **9.** Benzo(a)antraceno, **10.** Criseno, **11.** Benzo(b)fluoranteno, **12.** Benzo(k)fluoranteno, **13.** Benzo(a)pireno, **14.** Indeno(1,2,3-cd)pireno, **15.** Dibenzo(a,h)antraceno, **16.** Benzo(ghi)perileno. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Columna capilar de sílica fundida PTE™-5. La temperatura del detector fue de 320°C y la del inyector se programó para que estuviera 3°C arriba de la temperatura del horno. El programa de temperatura del horno fue: 60°C (1 min) hasta 250°C a 20°C y a 5°C/min hasta 320°C (20 min).

5.5.1.1 Recuperación de HAPs en la fracción alifática en tejido de pescado fortificado.

Para este estudio se analizaron por triplicado las fracciones alifáticas, de los extractos de pescado fortificado, purificadas por cromatografía en columna y EFS. La figura 8 y la tabla 8 muestran el porcentaje de recuperación de HAPs en la fracción alifática

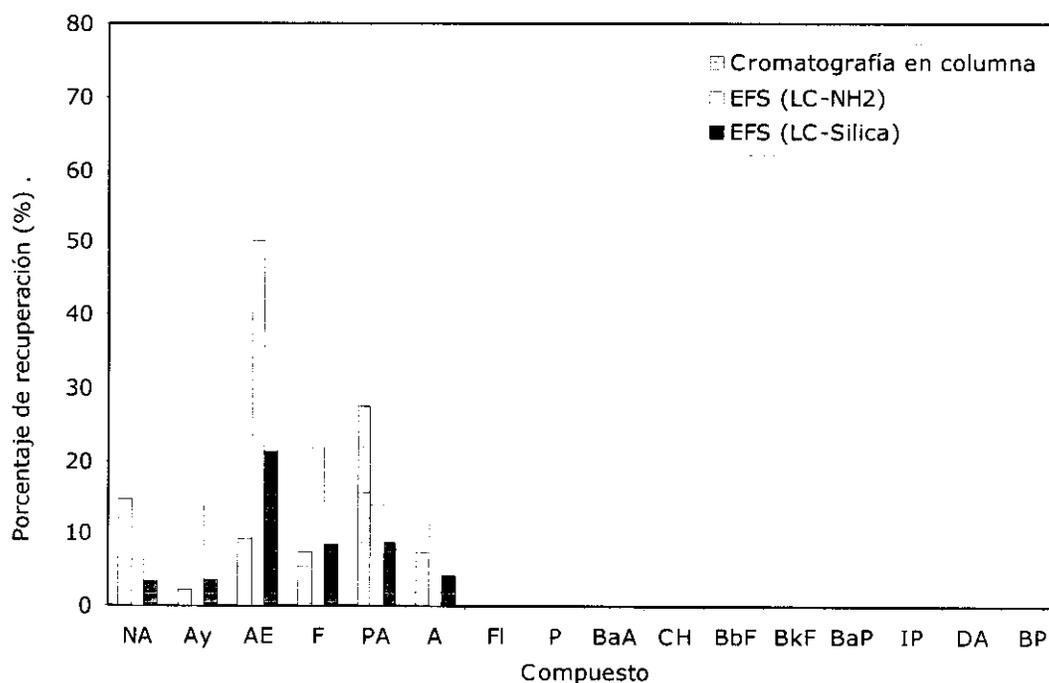


Figura 8. Porcentaje de recuperación de los HAPs en la fracción alifática en muestras de pescado fortificado (n=3).

Los seis primeros HAPs eluyeron en esta fracción, en ningún caso eluyeron HAPs de mayor pesos molecular.

Con los resultados obtenidos se comparó estadísticamente, a través de un análisis de varianza, los porcentajes de recuperación entre los diferentes procedimientos de purificación, cromatografía en columna y ambos absorbentes utilizados en la EFS (LC-NH₂ y LC-Silica), demostrándose que no existen diferencias significativas ($F_{2,15}=1.70$; $P\leq 0.21$).

Tabla 8. Resultados obtenidos en la fracción alifática(n=3).

Compuesto	Cromatografía en columna			EFS (LC- NH ₂)			EFS (Silica)		
	%	s	c.v	%	s	c.v	%	s	c.v
Naftaleno	14.76	2.71	73.34	6.30	0.80	50.53	3.22	0.41	45.47
Acenaftileno	2.22	0.16	29.37	14.13	2.63	24.60	3.49	0.31	33.28
Acenafteno	9.25	0.58	25.20	50.02	2.90	23.19	21.19	0.93	17.62
Fluoreno	7.26	0.72	39.56	21.72	1.72	31.65	8.30	0.39	18.89
Fenantreno	27.51	1.67	24.24	13.95	1.72	49.32	8.68	0.54	25.00
Antraceno	7.22	0.57	31.42	11.77	1.30	44.28	4.07	0.26	25.93

%
s
c.v

Porcentaje de recuperación promedio
Desviación estándar
Coeficiente de variación

Sin embargo, la variabilidad es alta en ambos procedimientos, debido posiblemente a que los compuestos que eluyeron en esta fracción son muy volátiles. Ejemplo de ello es el Naftaleno, cuyo coeficiente de variación fluctúa entre 45% (EFS LC-Silica) y 74% (cromatografía en columna), dependiendo del procedimiento de purificación utilizado (Tabla 8). La mayor variación se observa cuando se utiliza cromatografía en columna como procedimiento de purificación, lo cual probablemente se debe a que las fracciones obtenidas después de este paso son concentradas a sequedad y posteriormente reconstituidas antes del análisis.

Cabe señalar que durante el proceso de optimización de los disolventes usados para eluir estos compuestos se utilizó una solución estándar (*ver inciso 5.2*), y no se observó la elución de HAPs en la fracción alifática. Es probable que exista un efecto de matriz, ya que los 6 primeros HAPs son eluidos en la fracción alifática, con una gran variabilidad, en ambos procedimientos de purificación (cromatografía en columna y EFS).

5.5.2. Análisis de la fracción aromática.

En la figura 9a se muestra el análisis de la fracción aromática (benceno) obtenida por cromatografía en columna y, como se esperaba, la recuperación de los HAPs de dos y tres anillos fue menor. La fracción aromática se obtuvo libre de hidrocarburos alifáticos permitiendo la determinación de los HAPs. Sin embargo, otros analitos también eluyeron, como fenoles y ftalatos, que fueron identificados por CGC/EM.

El análisis de la fracción aromática obtenida por EFS con cartuchos de aminopropil y silica gel se muestra en las figuras 9b y 9c, respectivamente. Se observó que la fracción obtenida con cartuchos de aminopropil estuvo libre de analitos que interfirieran en la determinación de HAPs. En la fracción obtenida con cartuchos de silica gel (Figura 9c) no se observaron compuestos que interfirieran en la identificación de los analitos de interés, se identificó la presencia de ftalatos por CGC/EM. En ambos casos (LC- NH₂ y LC- Silica), no se detectó Naftaleno.

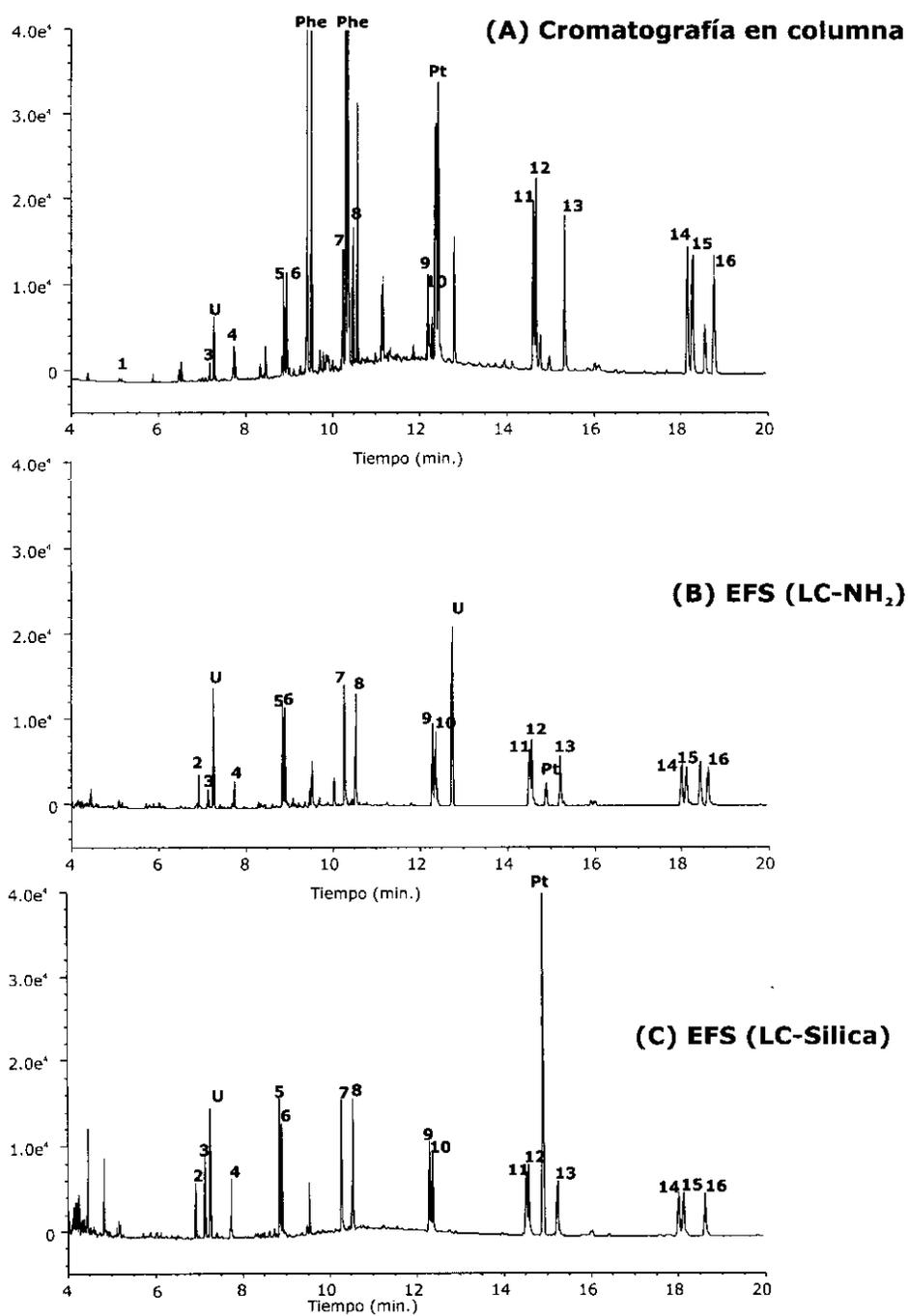


Figura 8. Cromatogramas de la fracción aromática del extracto de pescado fortificado y purificado por (a) Cromatografía en columna, (b) EFS (LC-NH₂) y (c) EFS (LC-Silica). La identificación de los compuestos como las condiciones cromatográficas son las descritas en la figura 7.

5.5.2.1 Recuperación de HAPs en la fracción aromática en tejido de pescado fortificado.
En la figura 10 y la tabla 9 se muestra el porcentaje de recuperación de los HAPs en la fracción aromática.

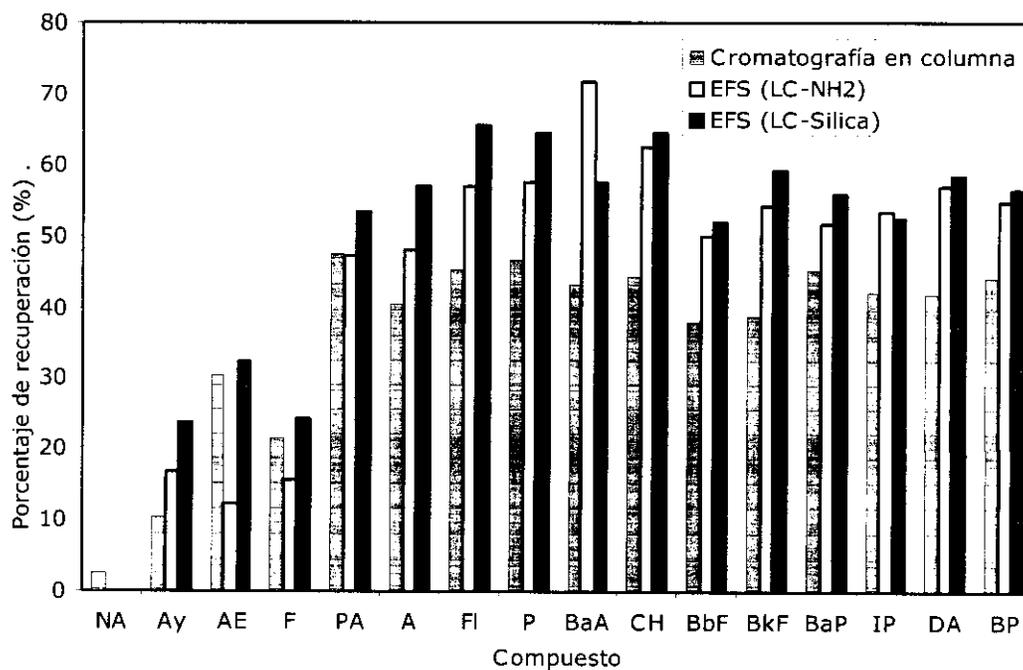


Figura 10. Porcentaje de recuperación de los HAPs en la fracción aromática en muestras de pescado fortificadas (n = 3).

La variación promedio fue 7.17% al utilizar los cartuchos de aminopropil (LC-NH₂), 8.29% para cartuchos de Silica gel y 23% para cromatografía en columna; estos resultados se calcularon sin considerar los 6 primeros HAPs.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la fracción aromática(n=3).

Compuesto	Cromatografía en columna			EFS (LC-NH ₂)			EFS (LC-Silica)		
	%	s	c.v.	%	s	c.v.	%	s	c.v.
Naftaleno	2.44	0.07	34.43	0.00	---	---	0.00	---	---
Acenaftileno	10.20	1.76	69.05	16.65	1.00	23.94	23.63	2.63	44.50
Acenafteno	30.27	2.42	31.97	12.34	0.93	30.29	32.46	3.08	37.95
Fluoreno	21.54	0.70	13.08	15.52	1.23	31.79	24.33	1.68	27.59
Fenantreno	47.45	2.62	22.09	47.17	1.74	14.77	53.23	1.39	10.42
Antraceno	40.47	2.20	21.72	47.84	1.67	13.96	56.97	1.83	12.88
Fluoranteno	45.03	2.73	24.28	56.96	0.79	5.56	65.48	2.08	12.71
Pireno	46.44	2.73	23.51	57.34	0.94	6.54	64.47	2.08	12.94
Benzo(a)antraceno	43.15	2.25	20.84	71.55	4.04	22.57	57.41	1.19	8.27
Criseno	44.40	2.31	20.79	62.53	1.66	10.60	64.51	1.79	11.11
Benzo(b)fluoranteno	37.88	2.04	21.56	50.01	0.64	5.11	51.88	0.91	7.03
Benzo(k)fluoranteno	38.70	2.28	23.53	54.03	0.66	4.87	59.03	0.99	6.73
Benzo(a)pireno	45.23	2.67	23.58	51.57	0.41	3.17	55.76	0.67	4.78
Indeno(1,2,3-cd)pireno	42.14	2.24	21.30	53.30	0.53	3.96	52.36	1.16	8.87
Dibenzo(a,h)antraceno	41.90	3.02	28.82	56.91	0.42	2.94	58.29	0.97	6.67
Benzo(ghi)perileno	44.10	2.41	21.83	54.52	0.87	6.35	56.41	0.53	3.78

% Porcentaje de recuperación promedio
s Desviación estándar
c.v Coeficiente de variación

El porcentaje de recuperación de HAPs en la fracción aromática fue $42.90 \pm 2.80\%$ utilizando el procedimiento de purificación por cromatografía en columna, $56.87 \pm 6.23\%$ para LC-NH₂ y $58.56 \pm 4.89\%$ en LC-Silica. Se compararon estadísticamente los datos obtenidos, a través de un análisis de varianza, demostrándose que existen diferencias entre los diferentes procedimientos de purificación ($F_{2,27}=31.4$; $P \leq 8.96 \times 10^{-8}$).

Las diferencias son significativas entre el procedimiento de purificación por cromatografía en columna y la EFS. Sin embargo, entre los dos diferentes absorbentes utilizados en la EFS los valores del porcentaje de recuperación son similares, por ello se aplicó una prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales y se observó que no existen diferencias entre el porcentaje de recuperación obtenido con aminopropil y silica gel, con una $t_{18,2}=-0.67$; $P \leq 0.51$.

5.5.3 Recuperación total de HAPs en tejido de pescado fortificado.

El porcentaje de recuperación total de HAPs para todo el protocolo fue $40.60 \pm 13.75\%$ utilizando el procedimiento de purificación por cromatografía en columna, $51.63 \pm 15.47\%$ para LC-NH₂ y $51.57 \pm 16.73\%$ en LC-Silica. Las pérdidas de HAPs de bajo peso molecular son importantes para compuestos como Naftaleno, Acenaftileno y Fluoreno (Tabla 10) para ambos procedimientos.

Tabla 10. Porcentajes de recuperación total en ambas fracciones.

Compuesto	Cromatografía en columna	EFS (LC-NH ₂)	EFS (LC- Silica)
Naftaleno	17.20	6.30	3.22
Acenaftileno	12.42	30.78	27.12
Acenafteno	39.52	62.36	53.64
Fluoreno	28.80	37.24	32.63
Fenantreno	74.96	61.12	61.91
Antraceno	47.69	59.61	61.04
Fluoranteno	45.03	56.96	65.48
Pireno	46.44	57.34	64.47
Benzo(a)antraceno	43.15	71.55	57.41
Criseno	44.40	62.53	64.51
Benzo(b)fluoranteno	37.88	50.01	51.88
Benzo(k)fluoranteno	38.70	54.03	59.03
Benzo(a)pireno	45.23	51.57	55.76
Indeno(1,2,3-cd)pireno	42.14	53.30	52.36
Dibenzo(a,h)antraceno	41.90	56.91	58.29
Benzo(ghi)perileno	44.10	54.52	56.41
Promedio	40.60	51.63	51.57

El porcentaje de recuperación promedio total de todos los HAPs estudiados se muestra en la figura 11.

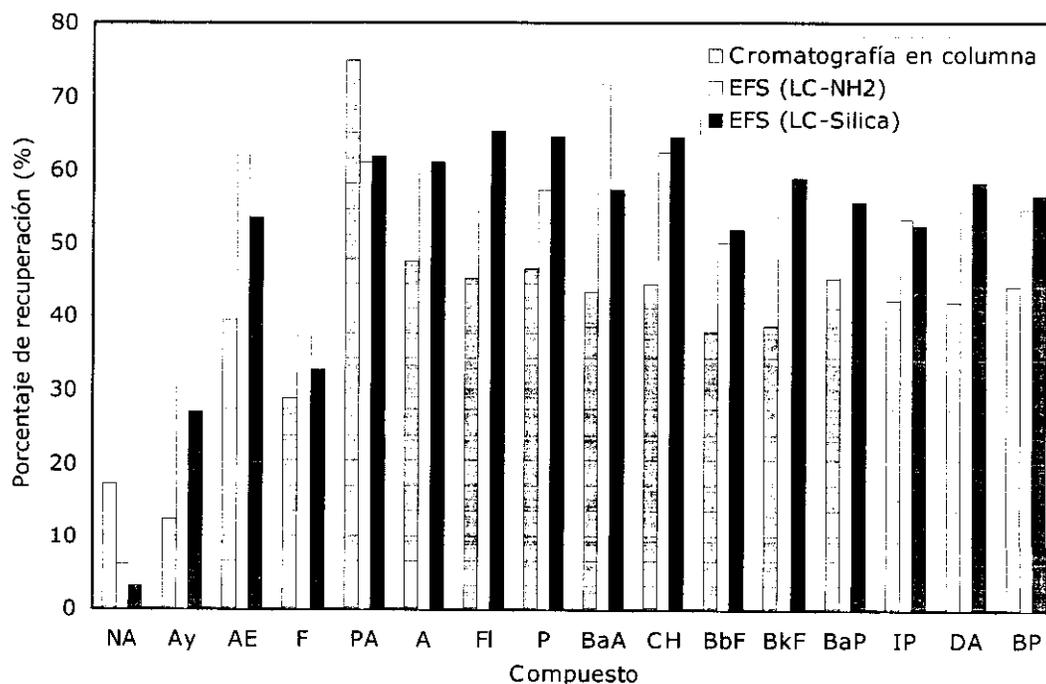


Figura 11. Porcentaje de recuperación total de los HAPs en muestras de pescado fortificadas (n = 3).

Comparando el porcentaje de recuperación obtenido por EFS con el realizado por Baumard y colaboradores (1997), en donde se obtuvo un porcentaje de recuperación de todo el protocolo del $72 \pm 7\%$, podría no considerarse aceptable. Sin embargo, en el estudio de Baumard (1997) se utilizó una solución estándar certificada de 23 HAPs (SRM 2260) la cual no contenía los 6 primeros compuestos, que son los que presentan una recuperación menor. En el presente estudio se utilizaron muestras fortificadas; si no se consideran los 6 primeros compuestos, el promedio del porcentaje de recuperación total de HAPs es de $42.90 \pm 2.80\%$ para cromatografía en columna, de $56.87 \pm 6.23\%$ para LC-NH₂ y para LC-Silica de $58.56 \pm 4.84\%$ y podrían considerarse como aceptables.

En el estudio de Baumard se encontró que la mayor pérdida de HAPs ocurría durante el paso de extracción líquido / líquido, con un porcentaje de recuperación en una solución estándar de $80 \pm 3\%$. El procedimiento de evaporación también representa pérdidas sobre todo para aquellos compuestos de bajo peso molecular (Baumard *et al.*, 1997).

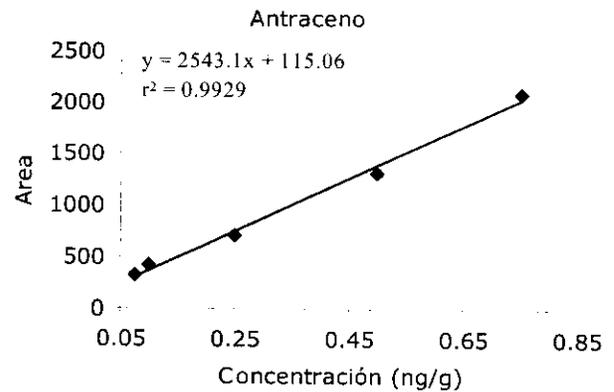
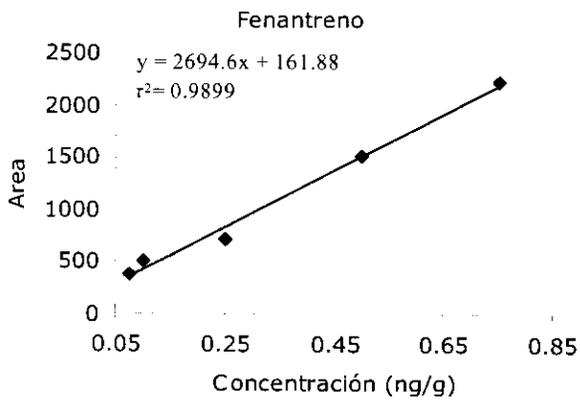
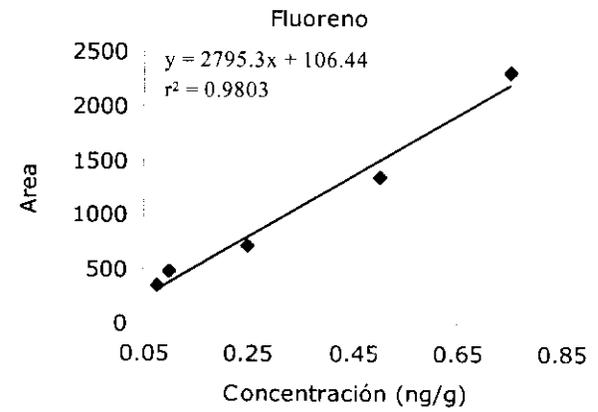
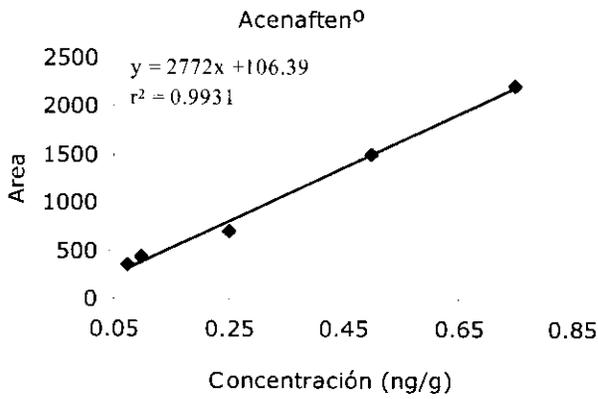
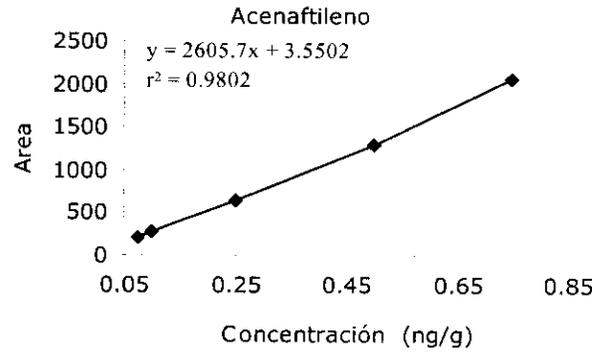
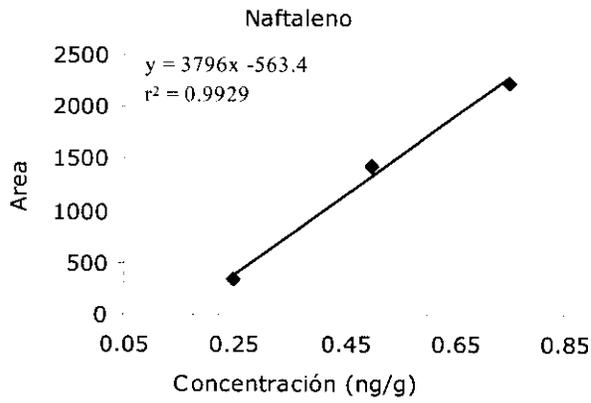
El procedimiento de extracción y saponificación utilizados en la investigación de Baumard y colaboradores (1997), así como los utilizados en el presente estudio son similares, por lo que se puede señalar que las mayores pérdidas ocurren durante los pasos de extracción líquido / líquido y preconcentración, mas no en la purificación de la muestra utilizando EFS, como se demostró en el presente estudio (*ver inciso 5.4*).

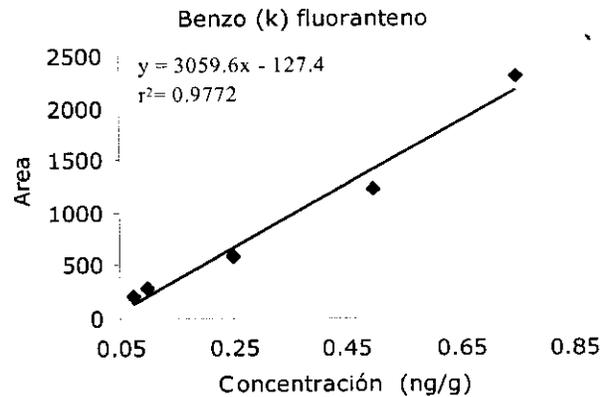
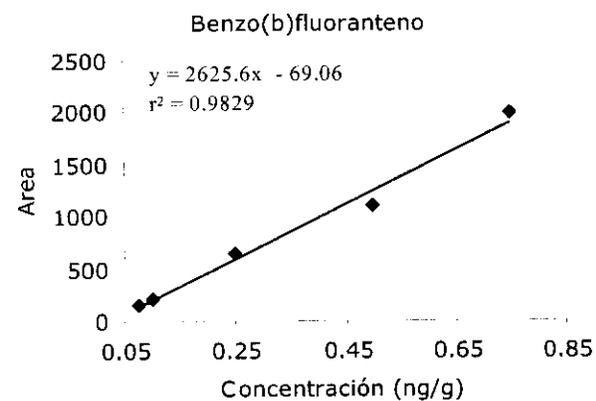
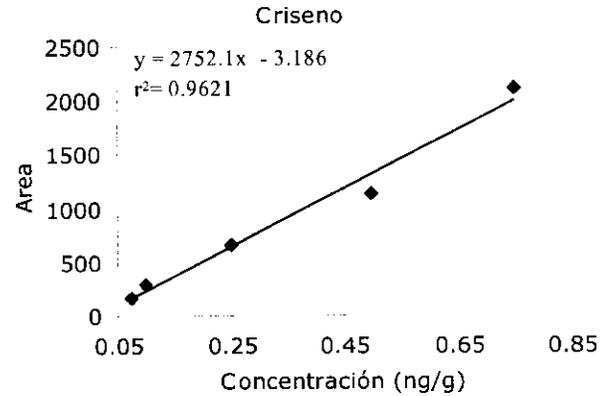
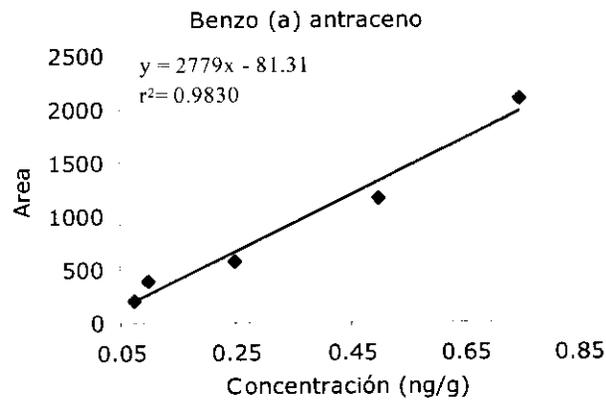
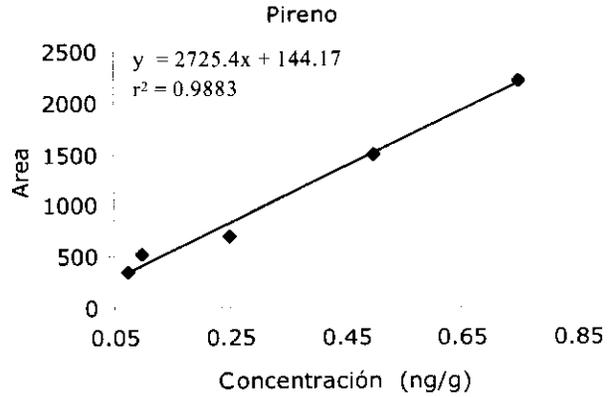
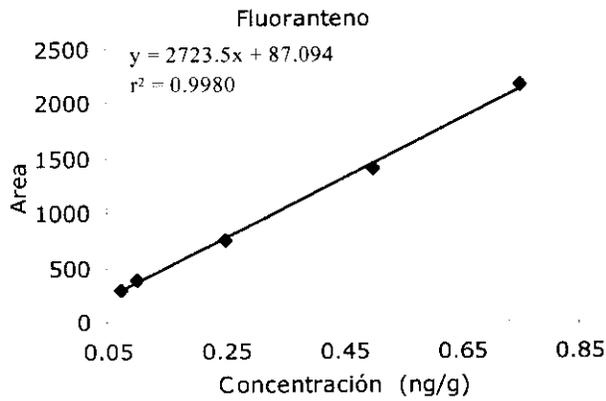
5.6 Calibración del método.

Como parte de la validación del método analítico se determinó su intervalo lineal, utilizando para ello muestras de tejido de pescado fortificado. El intervalo de concentración de la solución utilizada para la fortificación de las matrices fue: 75, 100, 250, 500 y 750 ppb. De acuerdo a los resultados obtenidos en la optimización de la metodología analítica (*ver inciso 5.5*) se determinó que el procedimiento de purificación que permitía un extracto más libre de interferencias es la EFS con cartuchos de aminopropil (LC-NH₂). Se analizaron las muestras de acuerdo al método descrito anteriormente y se obtuvo un extracto de cada una de las concentraciones. Los extractos fueron inyectados tres veces en el CGC, y con los datos generados se determinaron las curvas de calibración correspondientes para cada uno de los HAPs (Figura 12).

Para obtener el límite de detección se consideró el mismo como la cantidad de concentración de analito que proporcionará una señal igual a la señal del blanco (ruido) más 2 veces la desviación estándar del blanco. El límite de detección fue 75ng/g para todos los HAPs analizados a excepción del Naftaleno que fue 250ng/g.

Existe una correlación lineal significativa para 15 HAPs, lo cual se comprobó mediante una prueba t. Para los 15 HAPs, la hipótesis nula, en la cual se postulaba que no existía correlación entre x y y , se rechazó. A excepción del naftaleno, el valor calculado de t ($t \geq 11$) fue mayor que el tabulado ($t = 3.18$) para una probabilidad del 95%.





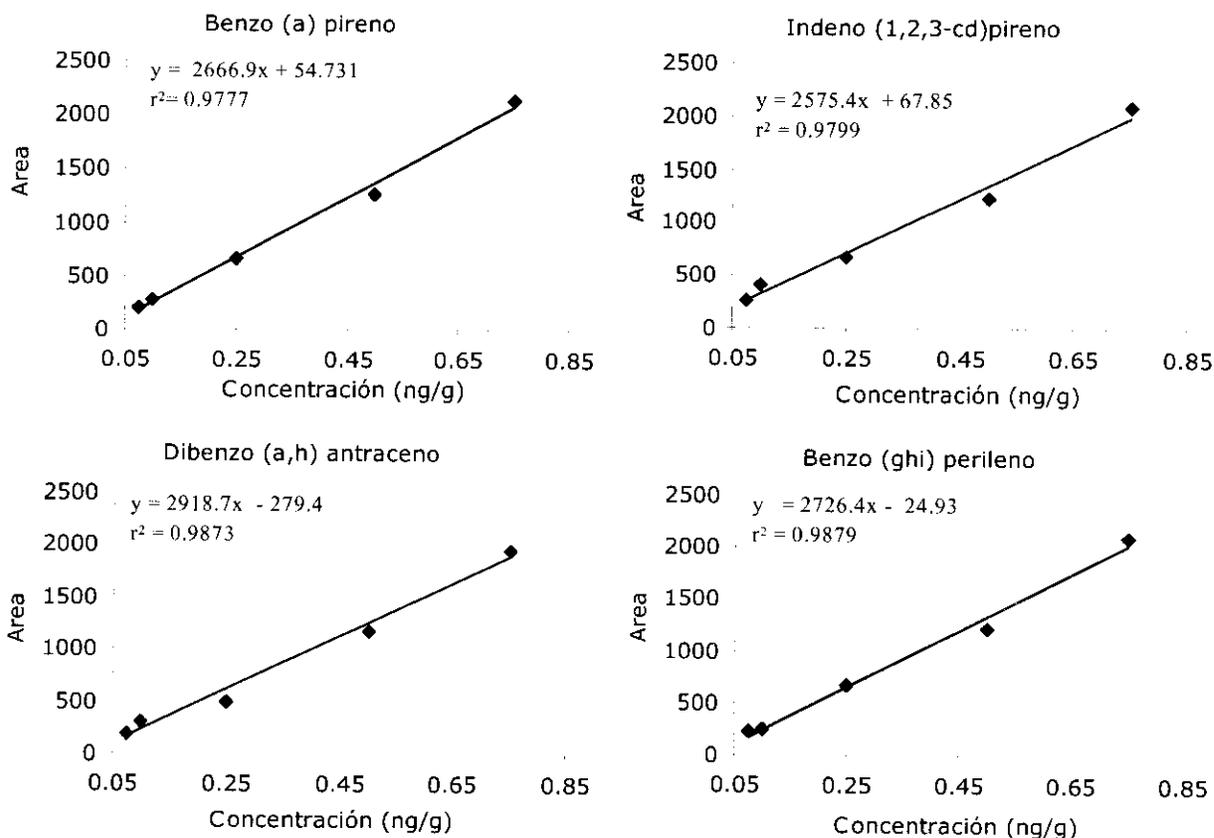


Figura 12. Gráficas de calibración de los 16 HAPs estudiados.

5.7 Ventajas y desventajas en el uso de la EFS.

El análisis de los HAPs en tejidos biológicos utilizando el procedimiento analítico propuesto toma 8 horas y media, para preparar y analizar una muestra. Sin embargo, el procedimiento puede ser sistematizado y realizar varias matrices al mismo tiempo. La ventaja del análisis de los HAPs empleando la EFS como medio de purificación es la reducción del tiempo de análisis. En el procedimiento analítico utilizando cromatografía en columna, como técnica de purificación, el tiempo del mismo incrementa 3 horas y media debido al tiempo utilizado en el empacado de la columna, la elución de las diferentes fracciones y la evaporación de las mismas. En consecuencia, se incrementan los costos por el empleo de mayor cantidad de reactivos y disolventes. En algunas ocasiones, al emplear

como técnica de purificación la cromatografía en columna, se ha reportado el requerimiento de una segunda purificación, ya que no se logra un extracto libre de interferencias (Baumard *et al.*, 1997).

Sin embargo, el manejo de los disolventes y cartuchos a emplear en la EFS debe ser el apropiado, ya que podría cambiar la actividad de los adsorbentes. La utilización de disolventes de alta pureza podría considerarse como una desventaja del uso de la EFS, no obstante se usan pequeños volúmenes de estos.

5.8 Aplicación del método propuesto en muestras de organismos marinos.

Una vez que la metodología se optimizó se analizaron muestras de pescado y camarón que fueron capturadas en regiones consideradas "contaminadas" y una muestra de ostión que fue adquirida en el supermercado

Se analizó una muestra homogénea de tejido de pescado, familia Mucrouidae, el cual fue capturado con una red de arrastre en la boca del Río Coatzacoalcos durante la Campaña Oceanográfica PROBMEX, realizada en marzo de 1999 (*ver inciso 4.5*). Este organismo es de hábitos bentónicos, por lo que vive en contacto con el sedimento.

En la figura 13a se muestra la fracción alifática del extracto de pescado, que muestra un típico perfil de mezcla compleja no resuelta (UCM, siglas en inglés). La cual es considerada como una consecuencia de la exposición de los organismos al petróleo crudo, intemperizado, degradado y sus derivados (Peña *et al.*, 1996). En esta fracción no se detectaron HAPs. Sin embargo, en el análisis por CGC/EM de esta fracción se identificaron compuestos como: fenol 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4 metil, hidrocarburos alifáticos (n-C₁₂ - n-C₃₅) y escualeno.

La figura 13b presenta el cromatograma de la fracción aromática, en donde se identificaron y cuantificaron: Antraceno ($0.88 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$) y Pireno ($0.087 \pm 0.002 \mu\text{g/g}$) mediante CGC. Utilizando CGC/EM (SIM y SCAN) se confirmaron los HAPs que se identificaron por CGC. En la figura 14 se muestra el cromatograma

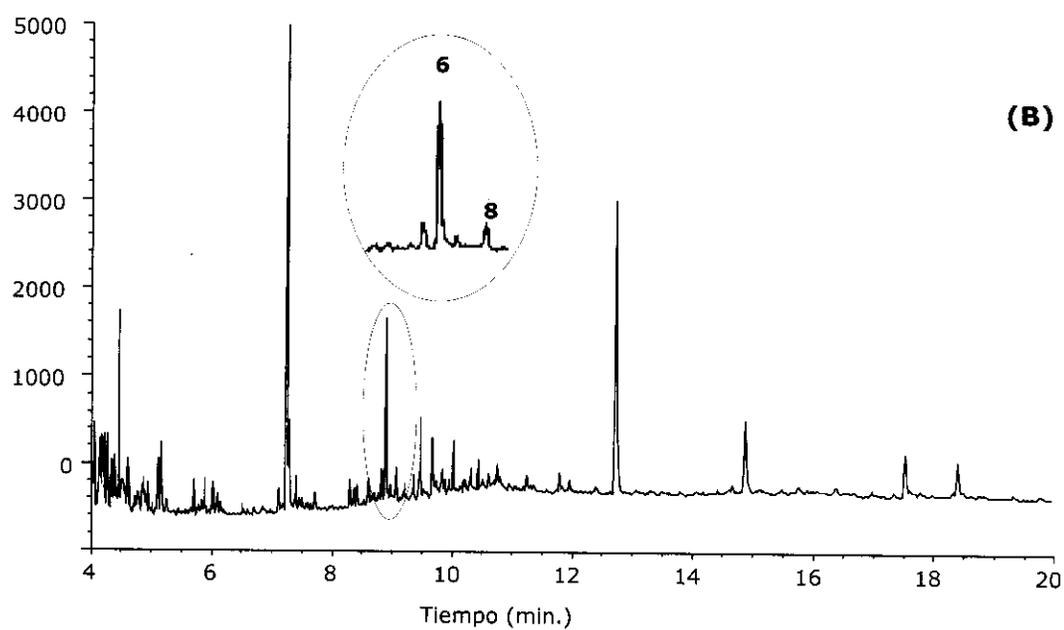
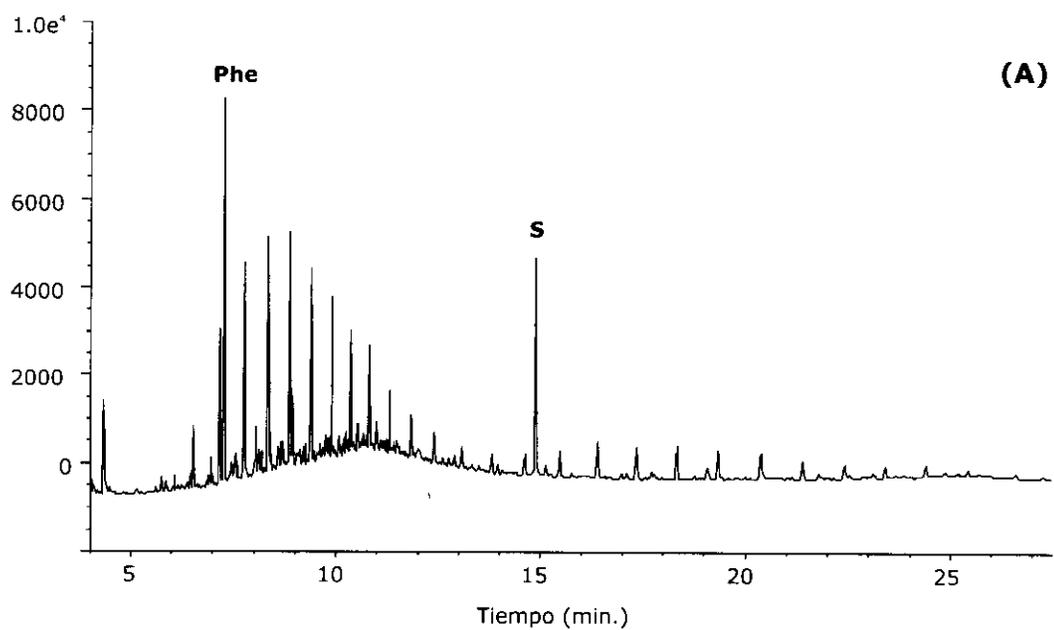


Figura 13. Cromatogramas de la fracción alifática (a) y fracción aromática (b) del extracto de pescado (Familia Mucrouridae, capturado en el Golfo de México) purificado por EFS LC-NH₂. La identificación de los compuestos como las condiciones cromatográficas son las descritas en la figura 7.

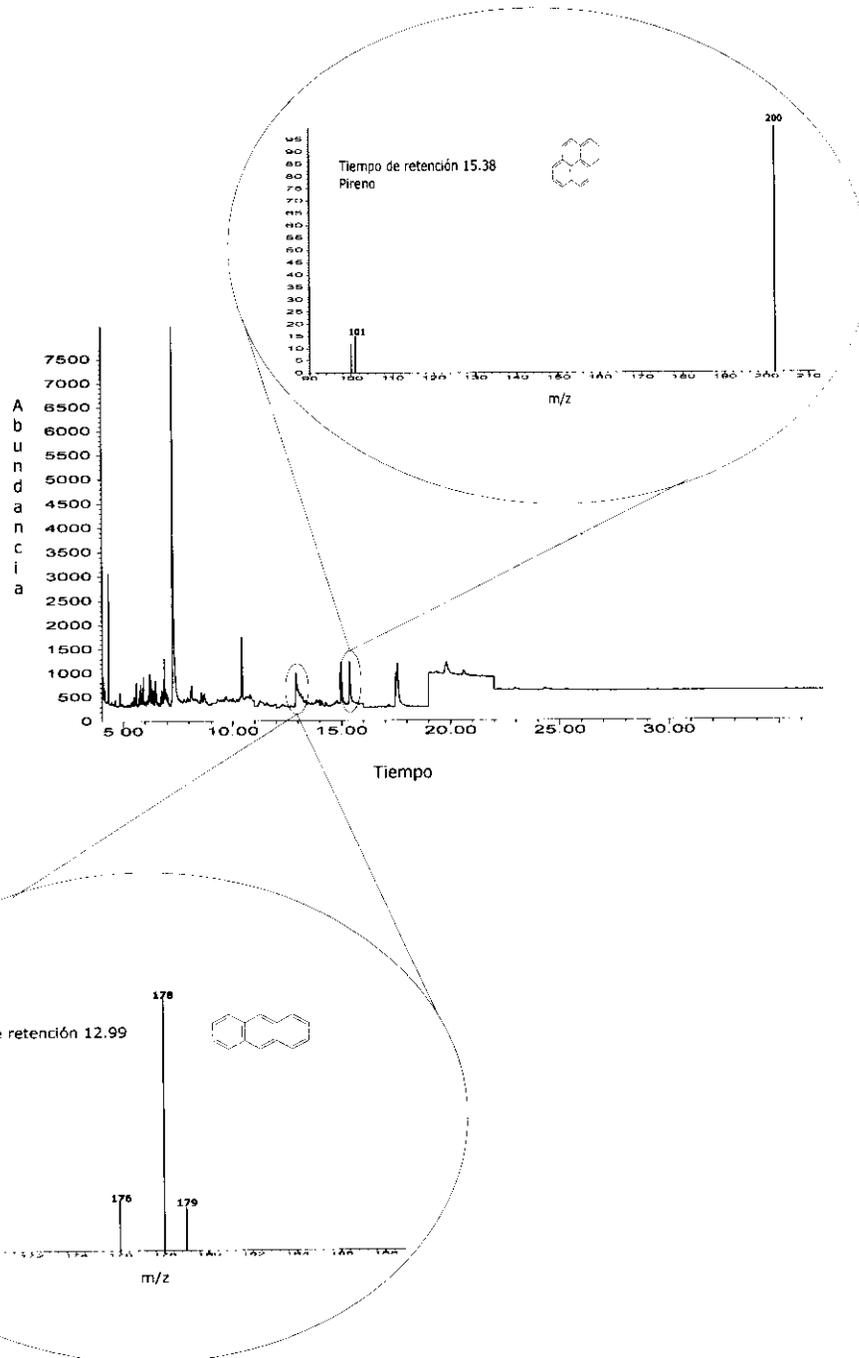


Figura 14. Cromatograma iónico (SIM) de la fracción aromática del extracto de pescado (Familia Mucrouridae) y purificado por EFS (LC-NH₂). La muestra fue inyectada en el sistema de Cromatografía de Gases Capilar – Espectroscopia de Masas (CGC – EM). Se utilizó el modo selectivo de iones (SIM, siglas en inglés). La columna capilar utilizada fue JW & Scientific DB5. El modo de inyección fue split/splitless (tiempo de splitless: 2 min). La temperatura del inyector fue 250°C. La línea de transferencia fue 280°C. El programa de temperatura del horno fue: 60°C (1 min) a 300°C (20 min) a 15°C/min.

iónico (SIM) de la fracción aromática y el espectro obtenido por SIM, en el cual se señalan los compuestos con los iones seleccionados para su identificación.

Los HAPs encontrados en el pescado son de bajo peso molecular, lo cual coincide con lo que se ha reportado anteriormente (Baumard *et al.*, 1998) y se atribuye a que estos organismos tienen la capacidad de biotransformar estos compuestos. También se analizó una muestra homogenizada de tejido de camarones (*Penaeus duorarum*) capturados por los pescadores del lugar en la Laguna de Términos, Campeche durante septiembre de 1998 (*ver inciso 4.5*). La figura 15 muestra los cromatogramas de las fracciones alifática (a) y aromática (b) de este análisis. En la fracción alifática se identificaron por CGC/EM (modo SCAN) hidrocarburos alifáticos desde n-C₁₅ hasta n-C₂₇, fenol y escualeno. En la fracción aromática se identificaron y cuantificaron por CGC: Fluoreno ($0.04 \pm 0.001 \mu\text{g/g}$), Fenantreno ($0.11 \pm 0.003 \mu\text{g/g}$) y Pireno ($0.05 \pm 0.006 \mu\text{g/g}$)(Figura 15b). La presencia de los HAPs identificados se confirmó por CGC/EM (SIM y SCAN). En la figura 16 se muestra el cromatograma iónico (SIM) de la fracción aromática del extracto de camarón.

El método propuesto también se aplicó a muestras de ostión (*ver inciso 4.5*), por ser considerado de interés en los estudios de monitoreo ambiental. En el extracto de ostión no se detectaron HAPs ya que estos organismos eran destinados para el consumo humano (Figuras 17a y 17b). Tanto la fracción alifática y aromática se inyectaron en el CGC/EM para confirmar estos resultados.

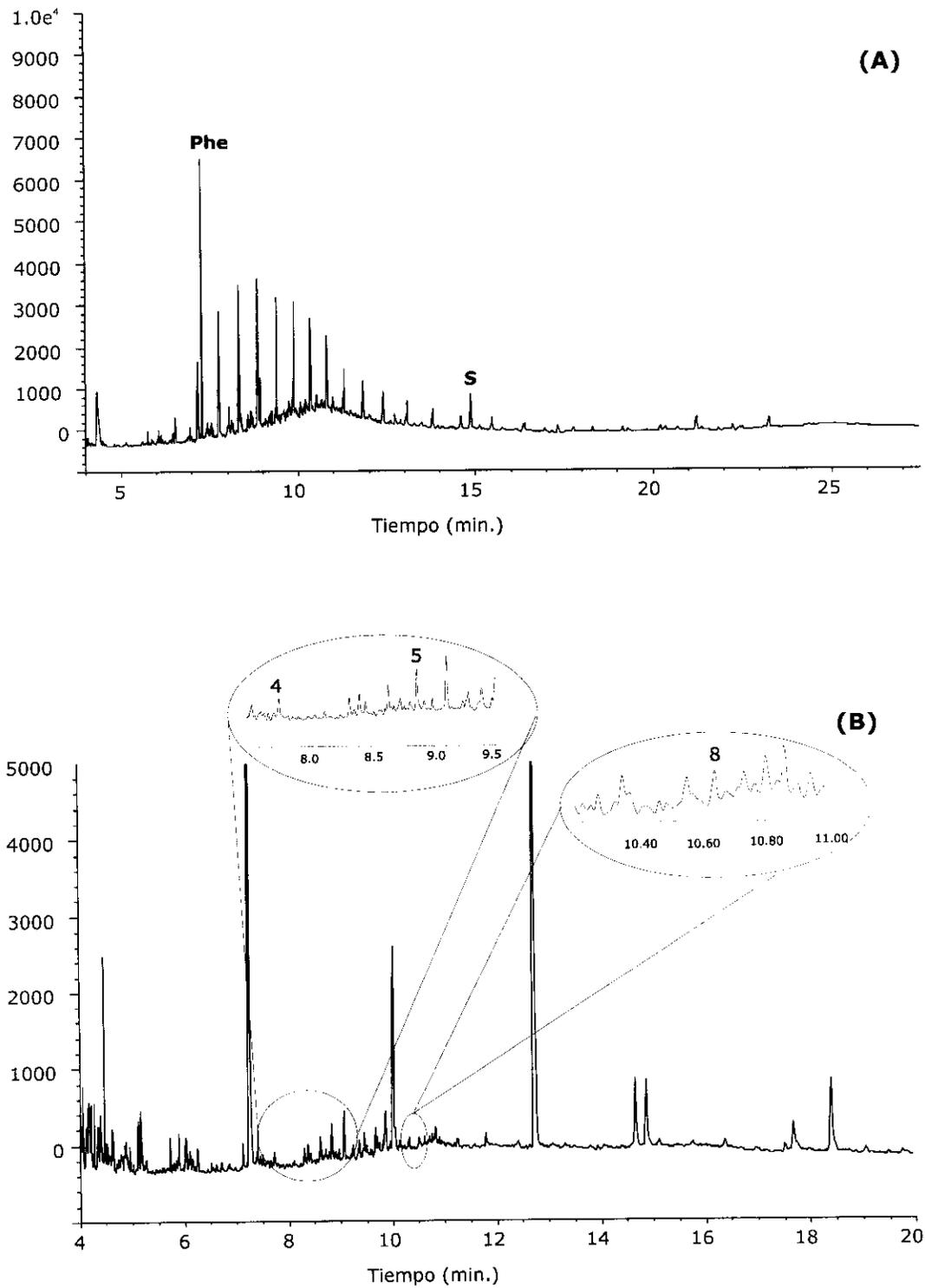


Figura 15. Cromatogramas de la fracción alifática (a) y fracción aromática (b) del extracto de camarón (*Penaeus duorarum*, capturado en la Laguna de Términos, Campeche/México) purificado por EFS LC-NH₂. La identificación de los compuestos y las condiciones cromatográficas están descritas en la figura 7.

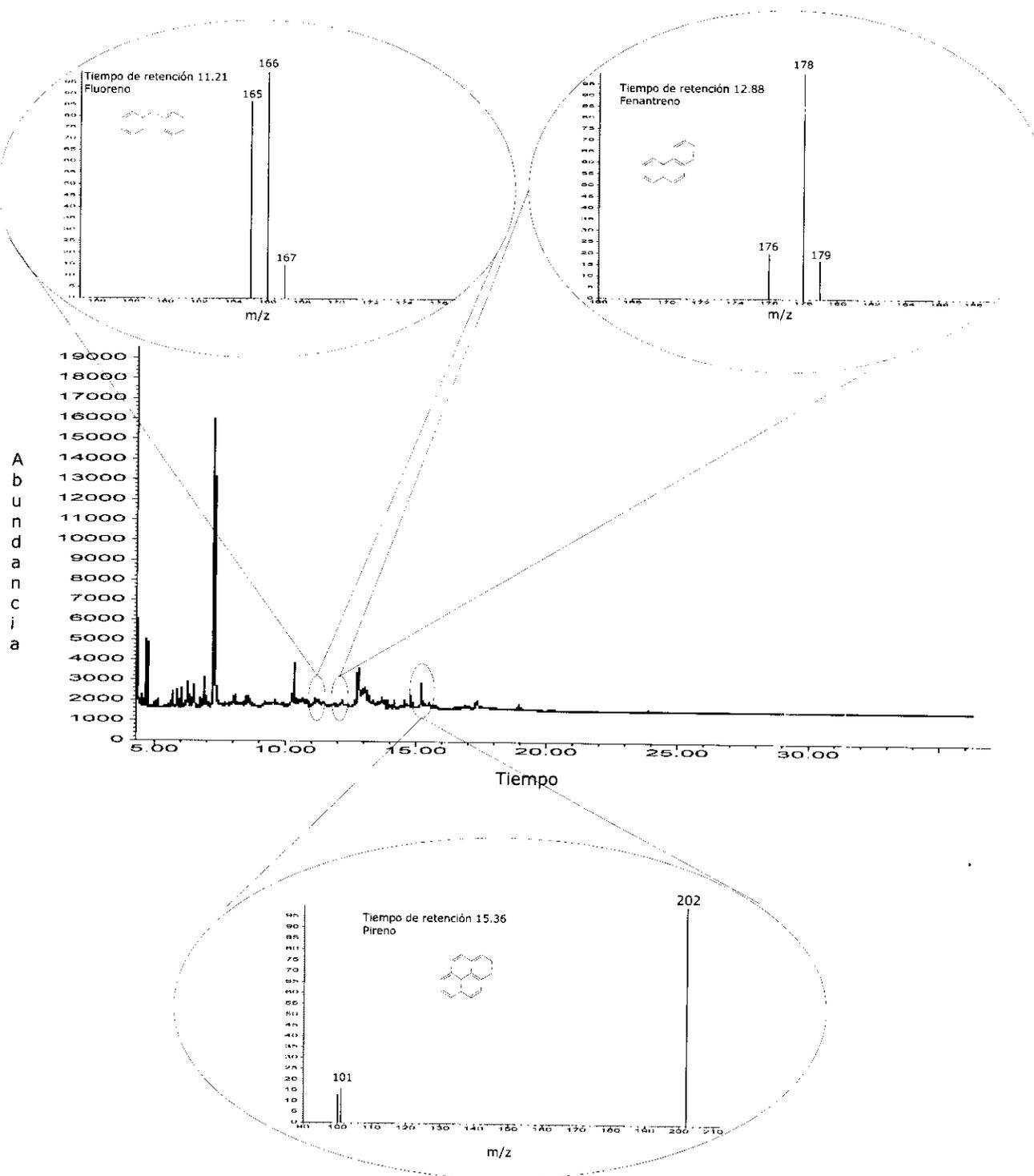


Figura 16. Cromatograma iónico de la fracción aromática del extracto de camarón (*Penaeus duorarum*) y purificado por EFS (LC-NH₂). Las condiciones cromatográficas se describen en la figura 13.

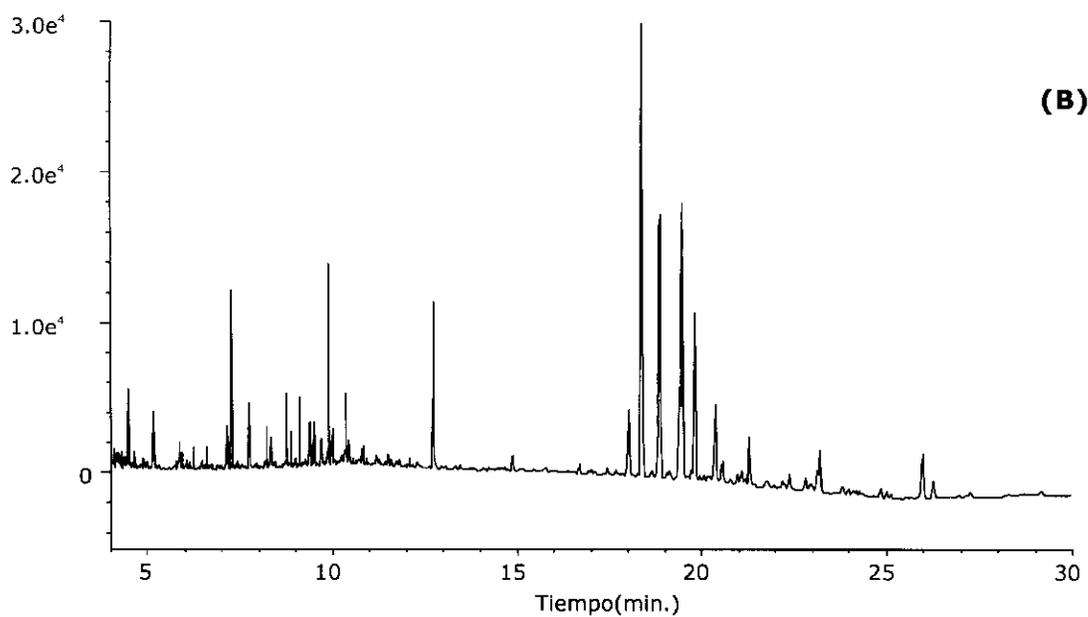
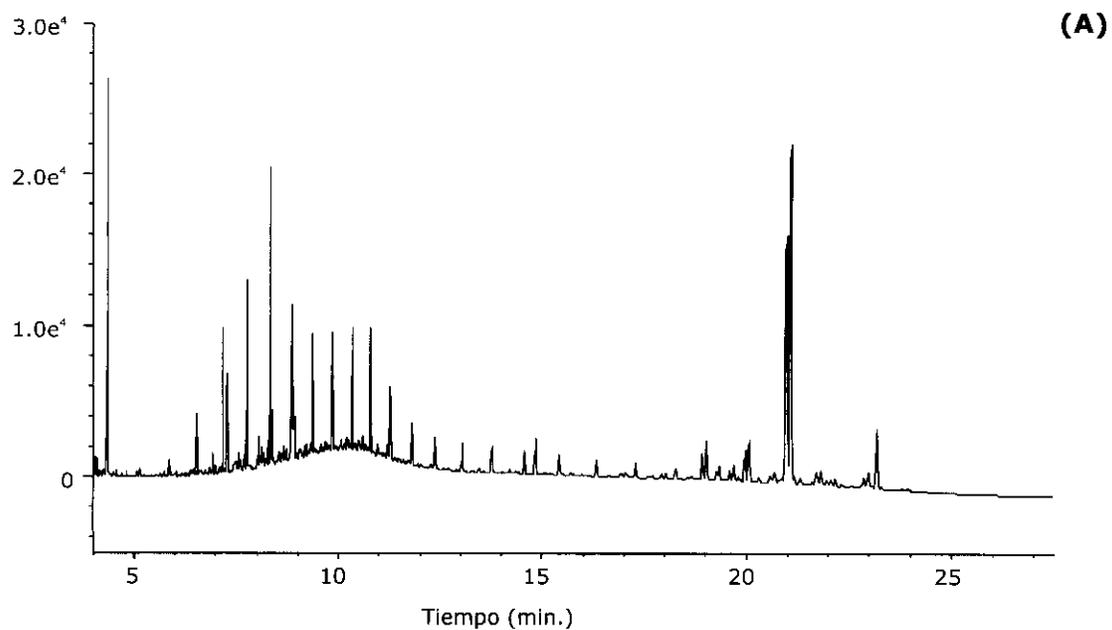


Figura 17. Cromatogramas de la fracción alifática (a) y fracción aromática (b) del extracto de ostión purificado por EFS LC-NH₂. La identificación de los compuestos como las condiciones cromatográficas son las descritas en la figura 7.

6. Conclusiones

- ⊗ La EFS puede ser una alternativa de purificación para el estudio de HAPs en organismos marinos.
- ⊗ La recuperación de los HAPs en la fracción alifática es variable en los diferentes procedimientos de purificación, particularmente en el caso de los de bajo peso molecular. Sin embargo, al realizar la limpieza con extracción en fase sólida se obtiene una mejor separación de las fracciones de los analitos.
- ⊗ Los porcentajes de recuperación total de HAPs fueron $42.0 \pm 2.80\%$ para cromatografía en columna, $56.87 \pm 6.23\%$ para EFS con LC-NH₂ y $58.56 \pm 4.84\%$ para EFS con LC-Silica.
- ⊗ El límite de detección del método propuesto fue de 250ng/g para el Naftaleno y de 75ng/g para los otros 15 HAPs estudiados. La curva de calibración propuesta para 15 HAPs fue de 75 a 750ng/g.
- ⊗ La EFS presenta ventajas sobre la purificación por cromatografía en columna como es la reducción del tiempo de análisis así como también el de reactivos y disolventes.
- ⊗ El método propuesto se aplicó en diversos tejidos de organismos marinos, reportándose HAPs de bajo peso molecular para las muestras de pescado y camarón analizadas. Se obtuvieron extractos puros libres de interferencias por lo que la identificación de HAPs por CGC fue sencilla, los cuales fueron confirmados por CGC/EM.
- ⊗ Se recomienda utilizar la EFS con cartuchos de aminopropil (LC-NH₂) para la purificación de muestras de tejido biológico, como son los de organismos marinos, de esta manera se evita realizar una segunda purificación si se realizará dicho procedimiento en cromatografía en columna y una segunda concentración del extracto, en donde las pérdidas son significativas.

7. LITERATURA CITADA

- Al-Saad, H. T. 1996. Distribution and Sources of Aliphatic Hydrocarbons in Fish from the Arabian Gulf. *Mar. Pollut. Bull.* **21**(3): 155 - 157.
- Alvarez, L. T., G. B. Gold y O. P. Zapata, 1994. Hydrocarbon Concentrations in Sediments and Clams (*Rangia cuneata*) in Laguna of Pom, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**: 39 - 45.
- Baumard, P., H. Budzinski y P. Garrigues. 1997. Analytical Procedure for the Analysis of PAHs in Biological Tissues by Gas Chromatography to Mass Spectrometry: Application to Mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.* **359**: 502 - 509.
- Baumard, P., H. Budzinski, P. Garrigues, J.C. Sorbe y J. Bellocq. 1998. Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in Various Marine Organisms in Relation to those in Sediments and to Trophic Level. *Mar. Pollut. Bull.* **36** (12): 951 - 960.
- Berrueta, L. A., B. Gallo, F. Vicente. 1995. A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments. *Chromatographia* **40**(7/8): 474 - 483.
- Botello, A. V. y S. A. Castro. 1983. Levels of Organic Pollution in Coastal Lagoons of Tabasco State, México; I: Petroleum. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **31**: 271 - 277.
- Botello, A. V., G. V. Ponce y G. G. Díaz. 1993. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's) en Areas Costeras del Golfo de México. *Hidrobiológica* **3**(1-2): 1- 15.
- Botello, A. V., S. F. Villanueva, G. V. Ponce, L. Q. Rueda, I. Ch. Wong y G. Barrera, 1995. La Contaminación en las Zonas Costeras de México. Comisión Nacional del Agua. México p. 35 - 122.
- Burns K. A. y A. H. Knapp. 1989. The Bahía Las Minas Oil Spill. Hydrocarbon Uptake by Reef Building Corals. *Mar. Pollut. Bull.* **20**: 391 - 398.
- CEPA, Canadian Environmental Protection Act. 1994. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Priority Substances List Assessment Report. Catalogue No.En40-215/42E. Ottawa 61p.
- Christie, W. W. 1987. Lipid Analysis. Pergamon Press (ed.) 2a.edición. Inglaterra.
- Chu, Fu-Lin, Li Tong, A. Volety, G. Constantin y R.C. Hale. 1997. Lipid Class Composition of Oysters, *Crassostrea virginica*, Exposed to Sediment-Associated PAHs. *Journal of Shellfish Research* **16**(1): 349 - 350.
-

- Crompton, T. R. 1985. Determination of Organic Substances in Water. Vol. I. J. Wiley and Sons. 350 p.
- Colmsjö, A. 1998. Concentration and Extraction of PAHs from Environmental Samples. Capítulo 2 en: A.H. Nielson (ed.) Part I PAHs and Related Compounds. Chemistry en la colección O. Hutzinger (ed.) The Handbook of Environmental Chemistry. Volumen 3. Antropogenic Compounds. Springer. Alemania.
- Crouch, M. D. y S. A. Barker. 1997. Analysis of Toxic Wastes in Tissues from Aquatic Species. Applications of Matrix Solid-Phase Dispersion. Journal of Chromatography A. **774**: 287 - 309.
- Dean, J. R., I. J. Barnas y I. A. Fowles. 1995. Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Highly Contaminated Soils: A Comparison between Soxhlet, Microwave and Supercritical Fluid Extraction Techniques. Analytical Proceedings Including Analytical Communications **32**: 305 - 308.
- DeLeon, I. R., J. B. Ferrario y C. J. Byrne. 1988. Bioaccumulation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by the Clam, *Rangia cuneata*, in the Vicinity of a Creosote Spill. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **41**: 872 - 879.
- Eisler, R. 1987. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Hazard to Fish, Wildlife and Invertebrates: A Synoptic Review. United States Fish and Wildlife Service, Western and Northern Region, Edmonton, Alta. 74p.
- Farrington, J. W., 1991. Biogeochemical Processes Governing Exposure and Uptake of Organic Pollutant Compounds in Aquatic Organisms. Environ. Health Perspect. **90**: 75 - 84.
- Farrington, J. W., E. D. Goldberg, R. W. Risebrough, J. H. Martin y V. T. Bowen, 1983. A Mussel Watch 1976-1978. An overview of the Trace Metal, DDE, PCB, Hydrocarbon and Artificial Radionuclide Data. Environ. Sci. Technol. **17**: 490 - 496.
- Fayad, N. M., A. H. El-Mubarak y R. L. Edora. 1996. Fate of Oil Hydrocarbons in Fish and Shrimp after Major Oil Spills in the Arabian Gulf. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **56**: 475 - 482.
- Fuoco, R. y M. P. Colombini. 1997. Chromatographic Analysis of Organic Micropollutants in Marine Environments. p. 173 - 187. en A. Gianguzza et al. (eds.) Marine Chemistry. Kluwer Academic Publishers. Holanda.
- Futoma, D. J., S. R. Smith, T. E. Smith y J. Tanaka, 1981. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Systems. CRC Press. E.U.A. 190p.

-
- Garrigues, P. y M. Ewald, 1987. High Resolution Emission Spectroscopy (Shpol'skii Effect): A New Analytical Technique for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in the Environmental Samples. *Chemosphere* **16**(2/3): 485 - 494.
- Garrigues, P., H. H. Soclo, M. P. Marniesse y M. Ewald, 1987. Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Recent Sediments from the Continental Shelf of the "Golfe de Gascogne" (Atlantic Ocean) and in the Gironde Estuary. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **28**: 121 - 131.
- Geraci, J. R. y D. J. St.Aubin. 1990. *Sea Mammals and Oil: Confronting the Risks*. Academic Press. San Diego, California. 282 p.
- GERG, Geochemical and Environmental Research Group., 1992. Extraction of Sediments for Hydrocarbon Analysis. Standard Operating Procedures. Approved May 5, 1992. Revision No.3 p.1 - 7.
- GESAMP, Joint Group of Experts on the Scientifics of Marine Pollution., 1990. Impact of Oil and Related Chemicals and Wastes on the Marine Environment. IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/AEA/UNEP. Reports and Studies No.50. 180 p.
- Gold, B. G., E. B. Norreña y O. P. Zapata, 1995. Hydrocarbon Concentrations in the American Oyster, *Cassostrea virginica*, in Laguna de Terminos, Campeche, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**: 222 - 227.
- González, C., A. V. Botello y G. G. Díaz, 1992. Presence of Aliphatic Hydrocarbons in Sediments and Organisms from Campeche Bank, Mexico. *Mar. Poll. Bull.* **24**(5): 267 - 270.
- Gratzfeld, H. A., R. Schuster y H. Schulenberg-Schell. 1993. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by HPLC. HP Application note 12-5091-7260E.
- Green, J. y M. W. Trett, 1989. *The Fate and Effects of Oil in Freshwater*. Elsevier Applied Science. 338p.
- Griest, W. H. y J. E. Caton. 1983. Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Quantitative Analysis. Capítulo 3 en: Bjorseth, A. (de.) *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Marcel Dekker, Inc. E.U.A.
- Hellou, J. 1996. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Mammals, Finfish, and Molluscs. Capítulo 9 en: Beyer, W.N., G.H. Heinz, A.W.N. Redman (eds.) *Interpreting Tissue Concentrations A Special Publication of SETAC*. Lewis Publishers. E.U.A.
- Hermida-Ameijeira, A., J. G. Simal, J. H. López y J. L. Simal. 1995. Evaluation of the Performance of a Multiresidue Gas Chromatographic Method for the
-

- Determination of Aliphatic Hydrocarbons in Mussels of Galicia (NW Spain).
Wat. Res. **29**(9): 2118 - 2124.
- Hilmer, T. y G. C. Bate, 1987. Hydrocarbon Levels in the Swartkops Estuary: A Preliminary Study. Water S.A. **13**(3): 181 - 184.
- IOCARIBE, 1987. Manual CARIPOL para el Análisis de Hidrocarburos del Petróleo en Sedimentos y Organismos Marinos. Mimeo. Cartagena, Colombia.
- Jackson, T. J., T. I. Wade, T. J. McDonald, D. L. Wilkinson y J. M. Brooks, 1994. Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Contaminants in Oysters from the Gulf of Mexico (1986-1990). Environmental Pollution **83**: 291 - 298.
- Junk G. A., J. J. Richard, M. D. Grieser, D. Witiak, J. L. Wihak, M. D. Arguello, R. Vick, H. J. Svec, J. S. Fritz y G. V. Calder. 1974. J. Chromatogr. **99**: 745.
- Kicinski, H. G., S. Adamek y A. Kettrup. 1989. Trace Enrichment and HPLC Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Chromatographia **28**: 203.
- Larsen P. F., D. F. Gadbois y A.C. Johnson. 1986. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Gulf of Maine Sediments: Distribution and Mode of Transport. Mar. Environ. Res. **4**: 231 - 244.
- Law R. J., T. W. Fileman, y J. E. Portman. 1988. Aquatic Environment Protection: Analytical Methods. No.2. Methods of Analysis of Hydrocarbons in Marine and Other Samples. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of Fisheries Research. Lowestoft.
- Lee, R., R. Sauerhebel y A. A. Benson. 1972. Petroleum Hydrocarbons; Uptake and Discharge by the Marine Mussel *Mytilus edulis*. Science (Washington, D.C.) **177**: 344 - 346.
- Lee, M. L., M. V. Novotny y K. D. Bartle. 1981. Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds. Academic Press, NY. EUA.
- Lipiatou, E. y J. Albaiges. 1994. Atmospheric Deposition of Hydrophobic Organic Chemicals in the Northwestern Mediterranean Sea: Comparison with the Rhone River Input. Mar. Chem. **46**: 153 - 164.
- Livingstone, D. R., M. A. Kirchin y A. Wiseman. 1989. Cytochrome P-450 and Oxidative Metabolism in Molluscs. Xenobiotica **19**: 1041 - 1062.
- Macias, J. V. Z. 1996. Distribution of Hydrocarbons in Recent Marine Sediments off the Coast of Baja California. Environmental Pollution **92** (1): 45 - 53.
- Mackay, D. y C. D. McAuliffe, 1988. Fate of Hydrocarbons Discharged at Sea. Oil and Chemical Pollution **5**(1): 1 - 20.
- MacLeod, W. D., D. W. Brown, A. J. Friedman, D. G. Burrows, O. Maynes, R. W. Pearce, C. A. Wigren y A. W. Bugar. 1985. Standard Analytical Procedures

-
- of the NOAA National Analytical Facility 1985-1986. Extractable Toxic Organic Compounds. 2ª. Ed. US Department of Commerce. NOAA/NMFS. NOAA Tech. Memo. NMFS F/NWX-92.
- MacLeod, W. D., A. J. Friedman, y D. W. Brown. 1988. Improved Interlaboratory Comparison of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Sediment. *Marine Environmental Research* **26**: 209 - 221.
- Mason, R. P., 1987. A Comparison of Fluorescence and Gas Chromatography for the Determination of Petroleum Hydrocarbons in Mussels. *Mar. Poll. Bull.* **18**: 528 - 533.
- Metcalf J.L. y M. N. Carlton. 1990. Freshwater Mussels as Biomonitors for Organic Industrial Contaminants and Pesticides in the St. Lawrence River. *Sci. Tot. Environ.* **97/98**: 595 - 615.
- Morales, J. W., 1998. Análisis de los Hidrocarburos Presentes en Agua, Sedimento y Organismos de los Sistemas Fluvio-Lagunares Pom-Atasta y Narváez, Campeche-Tabasco. Reporte Final de Servicio Social. CBS, UAM-Xochimilco, DEHA 59p.
- Neff, J. J. 1990. Composition and Fate of Petroleum and Spill Treating Agents in the Marine Environment p. 1- 33. En: J.R. Geraci y D.J. St. Aubin (eds.) *Sea mammals and oil: Confronting the Risks*. Academic Press. San Diego, California.
- Neff, J. M., 1979. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Sources, Fates and Biological Effects. Applied Science Publishers. LTD. London 262 p.
- NRCC (National Research Council of Canada). 1983. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Formation, Sources, Fate and Effects on Aquatic Biota. NRC Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality. Publication No.18981. Ottawa, Ont. 209 p.
- Payne, J. F., J. Kiceniuk, L. L. Fancey, U. Williams, G. L. Fletcher, A. Rahimtula y B. Fowler. 1988. What is a Safe Level of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Fish: Subchronic Toxicity Study on Winter Flounder (*Pseudopleuroneites americanus*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **45**: 1983 - 1993.
- Peltonen, K. y T. Kuljukka. 1995. Air Sampling and Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* **710**: 93 - 108.
- Peña, E., J. E. Conde y F. G. Montelongo. 1996. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and n-Alkanes in *Osilinus attratus* from the Coast of Tenerifi (Canary Islands) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**: 803 - 810.
-

- Petrick, G., D. E. Schulz y J. C. Duinker. 1988. Clean-up of Environmental Samples by High-Performance Liquid Chromatography for Analysis of Organochlorine Compounds by Gas Chromatography with Electron-Capture Detection. *J. Chromatogr.* **435**: 241 - 248.
- Poster, D. L., L. C. Sander, S. A. Wise. 1998. Chromatographic Methods of Analysis for the Determination of PAHs in Environmental Samples. Capítulo 3. A.H. Nielson (ed.) Part I PAHs and Related Compounds. Chemistry. en la colección O. Hutzinger (ed.) *The Handbook of Environmental Chemistry Volumen 3. Antropogenic Compounds.* Springer, Alemania.
- Quintero, S. y C. Díaz. 1994. Aliphatic Hydrocarbons in Fish from the Canary Islands. *Mar. Pollut. Bull.* **28** (1): 44 - 49.
- Risebrough, R. M., B. W. DeLappe, W. W. Walker II, R. I. Simoneit, J. Grimalt, J. Albarges, J. A. G. Regueriro, A. B. I. Nolla y M. M. Fernández. Application of the Mussel Watch Concept in Studies of Distribution of Hydrocarbons in the Coastal Zone of the Ebro Delta. *Mar. Pollut. Bull.* **14**: 181 - 187.
- Slooff, W., J. A. Janus, A. J. C. M. Matthijsen, G. K. Montizaan y J. P. M. Ros (eds). 1989. *Integrated Criteria Document PAHs.* National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM) Bilthoven, Netherlands, Report No.758474011. 199p.
- Smith, J. D. y W. A. Maher. 1984. Aromatic Hydrocarbons in Waters of Port Phillip Bay and the Yarra River Estuary. *Aust. J. Mar Freshw. Res.* **35**: 119 - 128.
- Snedaker, S. C., P. W. Glynn, D. G. Rumbold y E. F. Cacoran. 1994. Distribution of n-Alkanes in Marine Samples from Southeast Florida. *Mar. Pollut. Bull.* **30**(1): 83 - 85.
- Stegeman, J. J y J. J. Lech. 1991. Cytochrome P-450 Monooxygenase Systems in Aquatic Species: Carcinogen Metabolism and Biomarkers for Carcinogen and Pollutant Exposure. *Environ. Health Perspect.* **90**: 101 - 109.
- U.S., EPA Environmental Protection Agency. 1990. *Compilation of E.P.A.'s Sampling and Analysis Methods.* Compilado por Mueller, W. y D. L. Smith en: Keith, I. D. (eds.) E.U.A. 803p.
- Varansi, U., J. E. Stein y M. Nishimoto. 1989. Biotransformation and Disposition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish. p. 93 - 150. En: U. Varanasi (ed.) *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment.* CRC Press Boca Raton, Flo.

- Vicenti, M. 1997. Application of Mass Spectrometric Techniques to the Detection of Natural and Anthropogenic Substances in the Sea. p. 189 -209. en A. Gianguzza et al. (eds.) Marine Chemistry. Kluwer Academic Publishers. Holanda.
- Wakeham, S. G., C. Schaffner y W. Giger. 1980. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Recent Lake Sediments I Compounds Having Anthropogenic Origins. *Geochim. Cosmochim. Acta* **44**: 403 -413.
- White, K. L. 1986. An Overview of Immunotoxicology and Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Carcinogen. Rev.* **4**: 163 -202.
- Wild, S. R., M. L. Berrow y K.C. Jones. 1991. The Persistence of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Sewage Sludge Amended Agricultural Soils. *Environ. Pollut.* **72**: 141 - 157.
- Wise, S. A., S. N. Chesler, H. S. Hertz, L. R. Hilpert y W. E. May. 1977. Chemically-Bonded Aminosilane Stationary Phase for the High-performance Liquid Chromatographic Separation of Polynuclear Aromatic Compounds. *Anal. Chem.* **49**(40): 2306 - 2310.
- Witt, G. 1995. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and Sediment of the Baltic Sea. *Mar. Poll. Bull.* **31**(4-12): 237 - 248.